

E P



P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 661533	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05322	国際出願日 (日.月.年) 29.09.99	優先日 (日.月.年) 02.10.98
出願人(氏名又は名称) 財団法人化学及血清療法研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745, C07K1/22, A61K38/48		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745, C07K1/22, A61K38/48		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) REGISTRY (STN), CA (STN) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Gately S, et. al., 「Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibito r, angiostatin.」, Cancer Res (1996), 56(21), p. 4887-4890.	1-14
Y	Soff GA, et al., 「Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model.」, J Clin Invest. , (1995), 96(6), p. 2593-2600.	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 21. 12. 99	国際調査報告の発送日 28.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 斉藤真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	O'Reilly MS, et al., 「Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice.」, Nat Med. (1996), 2(6), p. 689-692.	1-14
A	O'Reilly MS, et al., 「Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.」, Cell. (1994), 79(2), p. 315-328.	1-14
A	Gately S, et al., 「The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin.」, Proc Natl Acad Sci U S A. (1997), 94(20), p. 10868-10872.	1-14
A	Briozzo P, et al., 「In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells.」, Cancer Res. (1988), 48(13)p. 3688-3692.	1-14



3/10/99  
09/08/99  
568  
Translation  
SCW

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661533	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05322	International filing date (day/month/year) 29 September 1999 (29.09.99)	Priority date (day/month/year) 02 October 1998 (02.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00, 9/50, C07K 14/78, 14/745, 1/22, A61K 38/48		
Applicant JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 23 March 2000 (23.03.00)	Date of completion of this report 12 December 2000 (12.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05322

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05322

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****Claims 1-10**

Document 1: Gately S. et al., "Human prostate carcinoma cells express and somatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin," Cancer Res. Vol. 56, No. 21, 1996, p. 4887-4890.

Document 2: Soff GA, et al., "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," J. Clin. Invest., Vol. 96, No. 6, 1995, p. 2593-2600.

Document 1 states that there is an enzyme (PACE) that acts to convert plasminogen to angiotensin in the culture supernatant of human prostate cancer cells (PC-3), and it also states that this angiotensin is a protease enzyme fragment containing plasminogen Kringle regions 1-4 and that it inhibits angiogenesis and metastasis of cancer cells.

It was well-known at the time of filing of this application that that the metastasis and growth of cancer is promoted when plasminogen is converted to plasmin by plasminogen activator. Document 1 states that a plasminogen fragment that inhibits cancer angiogenesis and contains Kringle regions 1-4 is produced in the supernatant of PC-3 cell cultures, and document 2 states that the plasminogen activator inhibitor PAI, which is effective in suppressing metastasis and angiogenesis of cancer cells, is present in the supernatant of PC-3 cell cultures. Therefore, in light of the inventions described in documents 1 and 2 and the aforementioned well-known information, persons skilled in the art can predict that it is extremely probable that another, previously unknown plasminogen fragment or plasminogen activator that has the effect of controlling cancer will be produced by PC-3 cells.

Therefore, in order to obtain novel factors that suppress the metastasis of cancer, persons skilled in the art can easily conceive of obtaining a factor that has activity similar to that of the cancer suppressing factors described in documents 1 and 2 from the culture supernatant of PC-3 cells, which are already known to produce factors that suppress the growth and metastasis of cancer.



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類</b> C12N 15/00, 9/50, C07K 14/78, 14/745, 1/22, A61K 38/48	A1	<b>(11) 国際公開番号</b> WO00/20570  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年4月13日(13.04.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/05322  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年9月29日(29.09.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/296095 1998年10月2日(02.10.98)  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO- THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto, (JP)  <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人</b> (米国についてのみ) 森河 亘(MORIKAWA, Wataru)[JP/JP] 〒862-8003 熊本県熊本市楠7丁目14-29 Kumamoto, (JP) 上仲一義(KAMINAKA, Kazuyoshi)[JP/JP] 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋みずき台3649 ガーデンコートみずき台 Kumamoto, (JP) 嶽本澄代(TAKEMOTO, Sumiyo)[JP/JP] 〒861-5522 熊本県熊本市下硯川町1619-2 硯川ハイッ Kumamoto, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 前田浩明(MAEDA, Hiroaki)[JP/JP] 〒860-0076 熊本県熊本市壺川1丁目1-12 栄久ハイッ Kumamoto, (JP) 野崎周英(NOZAKI, Chikateru)[JP/JP] 〒862-8001 熊本県熊本市武蔵ヶ丘5丁目26-1 Kumamoto, (JP) 宮本誠二(MIYAMOTO, Seiji)[JP/JP] 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋2066-8 Kumamoto, (JP) 青山 蓀, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54) Title:</b> ENZYME PRODUCING PLASMA PROTEIN FRAGMENT HAVING EFFECT OF INHIBITING CANCER METASTASIS AND PLASMA PROTEIN FRAGMENT FRAGMENTED BY THE ENZYME  <b>(54) 発明の名称</b> 癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素および当該酵素により断片化された血漿蛋白断片  <b>(57) Abstract</b> An aspartic acid enzyme having a high homology with a cathepsin D precursor, which is a protein starting at the N-terminal amino acid residue with LVRIPLHKFT and showing a molecular weight of about 45 kDa in non-reductive SDS electrophoresis and can degrade plasma proteins typified by plasminogen molecular species to give a plasma protein fragment having an effect of inhibiting cancer metastasis; the plasma protein fragment having an effect of inhibiting cancer metastasis which is prepared via the degradation with the above enzyme; a process for preparing the protein fragment having an effect of inhibiting cancer metastasis which comprises degrading a plasma protein with the above enzyme; and remedies against cancer metastasis which contain as the major ingredient the above enzyme or a fragmented plasma protein.		

(57)要約

N末端のアミノ酸残基がLVRIPLHKFTで始まり非還元系SDS電気泳動で分子量約45 kDa付近に認められる蛋白であり、プラスミノーゲン分子種で代表される血漿蛋白を分解し癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片を調製することのできるカテプシンD前駆体と高い相同性を示すアスパラギン酸酵素；当該酵素で分解し調製された癌転移増殖抑制効果を有する血漿蛋白断片；上記当該酵素で血漿蛋白を分解し、癌転移増殖抑制効果を有する蛋白断片を調製する方法；および当該酵素または断片化血漿蛋白を主要構成成分とする抗癌転移増殖治療薬を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	CM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素および当該酵素により断片化された血漿蛋白断片

5      **技術分野**

本願発明は、生化学的に活性な酵素、該酵素によって産生される生物活性を有する血漿蛋白断片、該血漿蛋白断片の調製方法及びそれらを用いた癌治療法の一形態に関する。詳細には、プラスミノーゲンあるいはフィブロンекチン分子種等の血漿蛋白質を分解し癌転移増殖抑制作用を有する断片を産する酵素、当該酵素を用いて得られる癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白質断片、及び当該血漿蛋白質断片の調製法に関する。従って本願発明は、前記酵素及び当該酵素によって断片化される血漿蛋白質断片に生化学あるいは医学的意義が存する分野、例えば癌の治療薬、予防薬の分野において広く利用される。

**背景技術**

15      現在の癌に対する外科的治療技術はめざましいものがあり、原発巣の術的切除治療に関してはほぼ完成された域に達したと評価され得る。しかし、临床上の術後の癌の再発、転移増殖といった課題に対してはまだ解決すべき問題は多く、特に遠隔転移増殖は癌患者を死に至らせる最大の原因となっている。

癌の転移増殖とは、原発巣から癌細胞が離脱し血管系を経て他の部位で癌が増殖することである。血管系で拡散された癌細胞が広範囲に増殖する状況では、いかに進歩した術的治療であってもこれを完全に取り除くことは不可能に近い。そのため、抗癌剤に代表される化学療法がこの予防、治療に用いられている。しかしこの場合も、化学物質に対する薬剤耐性の問題が避けられず、有効性の発現のための投与量の増大、それに伴う副作用の増大と問題は大きい。多くの技術がこれら諸問題の解決に費やされている一方で、癌細胞が血管系に進入することを抑制しようとする研究も現在活発に展開されている。癌浸潤抑制、血管新生阻害の研究がそれである。

癌細胞が血管系へ進入する経路は大きく2つに分けられるが、そのうち一つは癌細胞が血管側へ移行する経路、他方は血管を癌局部に導き入れる経路である。

前者は癌の浸潤と呼ばれており、後者は血管新生と呼ばれる。癌浸潤とは、転移増殖能力を獲得した癌細胞が原発巣（腫瘍）から離脱し、癌細胞と血管とを遮る間質というバリアーを分解し、さらにその間隙に浸潤して血管系に入りこむ現象である（Mignatti P. ら、J. Cell Biol., vol. 108, p. 671-682, (1989)）。

- 5        一方、血管新生とは、既存血管から新たな血管が生じる現象であり、この血管（新生血管）を通して癌は血流中へ移行する。血管新生は健常状態の成人個体では、女性の性周期あるいは創傷治癒時以外には認められず、主に、癌、糖尿病性網膜症、リウマチ、乾癬といった病的状態で生じる（Folkman J., Adv. Cancer Res., vol. 43, p. 175-203 (1985); Zetter B. R., Chest, vol. 93 (Suppl.),
- 10        p. 159S-166S (1998); Patz A., Invest. Ophthalmol. Visual Sci., vol. 19, p. 1133-1138 (1980); Amore D. ら, Ann. Rev. Physiol., vol. 49, p. 453-464 (1987))。癌細胞（腫瘍）は、自らの増殖に必要な酸素や栄養分を供給するため新しい血管を既存血管から導き入れるが、この血管（新生血管）は癌細胞の血管系への移行をより容易なものとしている。これら血管新生は癌細胞によって刺
- 15        激を受けた血管内腔に敷き詰められた血管内皮細胞の異化によるものであるが、これらが癌細胞に到達し新しい血管を形成するまでには、癌の浸潤過程と同様に基底膜の消化、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成といった多段階的な行程を経る。癌細胞が血管系へ進入する経路を阻害し転移増殖を抑制するという研究とは、換言すれば、以上示したいずれかの行程を阻害することである。このうちの
- 20        どの行程に焦点を当てるかについては議論があるところであるが、癌浸潤と血管新生に共有する間質の分解消化という過程は最も注目されるものである。

#### 間質の分解阻害

- 癌細胞と血管内皮細胞との間には、タイプ I V コラーゲンよりなる基底膜とコラーゲン類よりなる細胞外マトリックスが細胞浸潤のバリアーとして存在している。そのため、癌細胞が血流中に進入するためには、あるいは血管内皮細胞が癌細胞に到達するためにはこのバリアーを消化、分解しなければならない
- 25

（Stetler-Stevenson W.G. ら, Ann. Rev. Cell Biol. vol. 9, p. 541-573 (1993)）。これら分解酵素がマトリックス分解酵素と呼ばれる一群の酵素であり、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ等がこれらに該当する（Woessner, JF. Jr., FASEB



J., vol. 5, p. 2145-2154 (1991))。一般に癌部位ではこのマトリックス分解酵素が過剰発現しており、かつ活性化に関わるセリンプロテアーゼの過剰発現が認められる。さらに、癌部位では、活性阻害物質であるTIMP (Tissue Inhibitor of Metallo Protease) の発現低下が認められるため、酵素と阻害剤  
5 の関係に不均衡が生じ、癌細胞に転移増殖の環境を提供することが報告されている (Rak J. ら、Cancer Res., vol. 55, p. 4575-4580 (1995))。

そのため、この不均衡を是正するため、例えば、癌細胞にTIMP-I 遺伝子を導入したりマトリックス分解酵素を阻害する薬剤を投与する試みがなされており、このうち例えばゼラチナーゼの阻害剤であるBB-94 が実験的な転移増殖  
10 を抑制し、かつ血管新生を抑制することによって癌の増殖を抑制したとの良好な報告も多くなされている (Davis, B. ら、Cancer Res., vol. 53, p. 2087-2091 (1993) ; Rasmussen, H. S., Proceedings of the ICS 2nd. International conference on protease inhibitors, International business communications, (1997))。

#### 15 プラスミンと癌の関係

マトリックス分解酵素は一般に酵素前駆体の形態で細胞外に放出されており (Chen, W. T., Curr. Opin. Cell Biol., vol. 4, p. 802-809 (1992))、活性化に関わる当該酵素を阻害することによって間質の分解を阻害するという試みがある。マトリックス分解酵素はセリンプロテアーゼによる限定分解によって初め  
20 て活性化される性質をもつため、このセリンプロテアーゼを阻害することがそれに当たる。マトリックス分解酵素を活性化するセリンプロテアーゼとしてはプラスミン、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (以下、u-PA)、組織型プラスミノゲンアクチベーター (以下、t-PA)、及びトリプシンなどがある。このなかで特に血液線溶系の酵素であるプラスミンは癌細胞及び血管内  
25 皮細胞で活性化される共通の酵素である点で注目される。つまり、プラスミンとはその前駆体であるプラスミノゲンがu-PA、t-PA等のプラスミノゲンアクチベーターによって切断を受け活性化されたものであるが、癌細胞はu-PA産生能力を、血管内皮細胞はt-PA産生能力を有しており、癌状態ではともに高レベルで発現されているとの報告がある。

また、プラスミンには上述のマトリックス分解酵素を活性化させる以外に、例えば血管新生に関与する因子である  $TGF-\beta$  の活性化作用や自ら細胞外のマトリックスを分解する能力を持っている (Werb Z. ら、N. Engl. J. Med., vol. 296, p. 1017 (1977); Brunner G. ら、J. Cell Biol., vol. 6, p. 1275-1283 (1991))。さらに、プラスミンはフィブリン膜で癌を取り囲みその分散を抑制しようとする宿主側の防御機構を破る能力を有していると考えられている。

以上の結果を考慮すれば、プラスミンの発現は癌存在部位においては浸潤を促す方向に傾いていると推察される。実際、プラスミンの阻害剤が実験動物の癌転移増殖を抑制したとする知見も報告され、このことを裏付けている (Ohta T. ら、癌と臨床 vol. 23, p. 1669-1672 (1996); Ohkoshi M, 癌と化学療法, vol. 22, p. 417-430 (1995))。

#### アンジオスタチン様分子の癌転移増殖抑制作用

一方、プラスミノゲンまたはプラスミンを断片化した物質に癌の増殖あるいは浸潤を抑制する作用があることが報告されている。すなわち、血管新生阻害物質(アンジオスタチン)に関する報告がそれである (O'Reilly M. S. ら、Cell, vol. 79, p. 315-328 (1994))。アンジオスタチンはプラスミノゲンの内部断片からなる血管新生阻害物質であり、微量で血管新生及び癌転移増殖巣増殖を強力に阻害する作用を有しており、さらに、驚くべきことに副作用、薬剤耐性もなく量依存的に癌(原発巣)を退縮させる能力を持つ (O'Reilly M. S. ら、Nat. Med., vol. 2, p. 689-692 (1996))。アンジオスタチンに関しては O'Reilly らの詳細な実験によって血管新生及び癌抑制の関係が示されている。しかし、それらに対するアンジオスタチンの作用機作、およびその産生に関しては未だ不明な点が多い。

前述の知見は、プラスミンの産生は癌転移増殖を導きプラスミノゲンまたはプラスミンの断片化はそれを抑制するという仮説を示唆するものである。癌状態ではこれらのバランスが崩れ癌転移増殖の方向に向いているとすれば、これを断片化方向へ転換することによって癌転移増殖を抑制することができる。つまり、プラスミノゲンまたはプラスミンを切断し、かつ上述のアンジオスタチン様分子を産生する酵素が癌の進展に対する生体側の防御機構として備わっているは

ずである。本願発明者らは上述の仮説の真偽を証明するべく、プラスミノージェンまたはプラスミンを断片化しアンジオスタチン様分子を産生する酵素の探索を行った。

### 発明の開示

5 上述の課題を解決する目的で鋭意検討の結果、本願発明者らは、前立腺癌細胞株であるPC-3培養液中にpHが低い環境でのみプラスミノージェンを断片化する新しい酵素活性を見出した。本酵素によって産生されるプラスミノージェン断片はプラスミノージェンクリングル1～4を含む断片であり、また、本酵素はプラスミンの活性中心付近を切断することによりその活性を失わせることも明らかになった。前記活性は癌細胞で多く発現されており、癌に対する特異性が示唆された。

10 各種のクロマトグラフィーに基づいて精製した結果、本酵素は分子量約45 kDaの酵素であり、N末端アミノ酸配列はLVRLPHKFTから始まり、このN末端配列はヒトカタレプシンD前駆体(Human Cathepsin D Precursor)に高い相同性を示すことが判明した。また、阻害剤を用いた検討によりアスパラギン酸酵素に分類されることが判明した。本願発明者らは得られた本酵素を低pHで活性発現することに因み、PACE 4 (Plasminogen Angiostatin Converting Enzyme of pH4)と命名した。

さらに、PC-3培養上清から精製した本酵素をプラスミノージェンに作用させて得られたプラスミノージェン断片を、ルイス肺癌を移植したマウスモデルに投与した結果、当該断片に癌細胞の転移増殖抑制作用があることが確認された。また、20 多くの血漿成分を本酵素で切断し、得られる断片をその血管新生阻害作用に着目してスクリーニングを実施した結果、前述のプラスミノージェン以外にも、細胞接着に関与する成分であるフィブロネクチン、ビトロネクチンあるいはヒト肝細胞増殖因子(HGF)等の血漿蛋白が本酵素によって断片化され、当該断片化血漿蛋白が強い血管新生抑制作用を示すことが見出された。

25

### 図面の簡単な説明

図1は、PC-3培養上清とプラスミノージェンを各種pHで反応させた際のプラスミノージェンの断片化を示す図である。

図2は、プラスミノージェン断片化酵素の測定方法の概念を示す図である。

図3は、PC-3培養上清を疎水クロマトグラフィーで処理した際の溶出パターンを示す図である。

図4は、精製したPACEのSDS-PAGEの泳動図である。

図5は、純化したPACE4を各種プロテアーゼインヒビターと反応させその阻害様式を検討した結果を示す図である。

図6は、精製したPACE4とプラスミノーゲンをpH7.0とpH4.0の条件下で反応させた際の切断様式を示す図である。

図7は、プラスミノーゲン(Glu-1)をPACE4で切断した際の経時的な切断様式を示した図である。

図8は、PACE4によるプラスミン活性の消失を示す図である。

図9は、PACE4の癌細胞転移増殖巣増殖抑制作用を示す図である。

図10は、各種癌細胞からのPACE4の産生についての検討結果を示す図である。PACE4活性をプラスミノーゲンの分解量で示した。

図11は、PC-3におけるプラスミノーゲンの分解についての検討結果を示す図である。(A)はPC-3において産生されたプラスミノーゲン断片物のSDS-PAGEの泳動図である。(B)は抗ミニプラスミノーゲン抗体、抗LBS-I抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す図である。

図12は、Glu-プラスミノーゲンとLys-プラスミノーゲンのPACE4による切断の速度を比較した結果を示す図である。

図13は、PACE4によって産生されたプラスミノーゲンクリングル1~4を含む断片の電気泳動図である。

図14は、PACE4によるフィブロネクチンの切断に関し、各種条件でPACE4とフィブロネクチンを接触した後の反応液の電気泳動図を示す。

図15は、フィブロネクチンをPACE4によって断片化した産物を血管内皮細胞に作用させた結果を示す図である。

### **発明を実施するための最良の形態**

#### **当該酵素活性の発見**

アンジオスタチン様分子を産生し且つプラスミンの活性を失わせる酵素を探索するための優先的方策は、先ず、アンジオスタチンの産生酵素を見出すことであ

る。既報によれば、アンジオスタチンはルイス肺癌の亜種である 3 L L-LM を移植されたマウスの血漿、尿中に見出されており、当該マウスの体内にはアンジオスタチンを産生する酵素が存在する筈である。O'Reilly らは、悪性腫瘍摘出後に希に認められる遠隔転移増殖巣の急速な増殖に着目して 3 L L-LM 細胞を用いたモデルを作製し、その血漿、尿中に強力な血管新生阻害因子を見出し、アンジオスタチンの発見に至った。癌状態では原発巣（癌）に由来する因子が血流内を循環し遠隔転移増殖巣の増殖を抑制しているというものである。また、アンジオスタチンに限って言及すれば、癌細胞はプラスミノゲンを産生しないことから癌細胞に由来する酵素が血中のプラスミノゲンを切断し、アンジオスタチンを産生させている、と推察することができる。

アンジオスタチンを産生する酵素については各研究施設から種々の候補が報告されている。Gately らは、近年、ヒト前立腺癌細胞 (P C-3 細胞) の細胞培養上清中にアンジオスタチンに断片化する活性があることを報告し、この活性をもたらず酵素を P A C E (Plasminogen Angiostatin Converting Enzyme) と命名した (Gately S. ら、Cancer Res., vol. 56, p. 4887-4890 (1996))。P C-3 細胞は、癌の原発巣の摘出が逆に遠隔転移増殖巣の増殖を促進させる特質を持つヒト型の細胞であり (Soff G. A. ら、J. Clin. Invest., vol. 96, p. 2593-2600 (1995))、この癌細胞が産生するヒトアンジオスタチン及びアンジオスタチン産生酵素 (P A C E) は注目されるものである。また、彼らはプラスミノゲンと P C-3 培養上清とを反応させることによって得られるプラスミノゲン断片を調製し、この断片が O'Reilly らの報告したアンジオスタチンと同等の血管新生阻害効果を有することをインビトロ、インビボの両系で示した。

また、癌環境に認められるマクロファージの浸潤に着目し、マクロファージに由来する酵素 (マトリックスメタロエラスターゼ) がアンジオスタチンを産生させる酵素であることを明らかにした Dong らの報告 (Dong Z. ら、Cell, vol. 88, p. 801-810 (1997))、及びマトリックスメタロプロテイナーゼ (Matrix metallo proteinase ; MMP) のスクリーニングの中でその活性が認められた Brain らの MMP-7 (Matrilysin と称される)、MMP-9 (Gelatinase B と称される) に関する報告もある (Brain C. ら、J. Biol. Chem., vol. 272, p. 28823

ー28825 (1997))。

しかし、当時、Gately らのP A C Eはその活性のみの評価であり、その活性の本態である酵素については単離・確認されていない状況であった。従って、本願発明者らは当初P A C Eを単離・精製することを目的として Gately らの実験を追試した。確かに、Gately らの方法によって調製したP Cー3培養上清をプラスミノーゲンに反応させた場合、アンジオスタチンに相当する50kDaに分布するプラスミノーゲンの断片化物がSDS-PAGE上で確認できた。しかし、この切断様式は特異性に乏しく、少なくともP A C Eがプラスミノーゲンを特異的に切断しているとは断言できないものであった。

本願発明者らは独自のスクリーニング系を構築し、所望の当該酵素の単離・精製を試みた。鋭意検討の結果、幸いにも、P Cー3培養上清中には中性域でプラスミノーゲンを断片化する酵素の他に、低いpHの条件下でプラスミノーゲンの限定部位を特異的に切断し得る、Gately らのP A C Eとは全く異なる従来報告されていない酵素活性を見出すことに成功した。この酵素の切断様式は図1に示すように、P A C Eの非特異的な切断とは異なり、プラスミノーゲンの限定部位を特異的に切断するものであった。

本願発明者らは以前より癌状態における低pHに着目しており、エラスターゼで切断したある種のプラスミノーゲン断片が低pH環境部位に集積する可能性について報告した(第56回日本癌学会総会抄録、p. 426、1997年)。また、この低pHで作用する酵素が癌状態と関係する知見を、各種癌細胞及び正常細胞を用いた酵素活性の検討によって見出しており、この酵素が癌状態でのみ大量に産生されることを予備的な検討によって察知していた。前述のように、本願発明者のスクリーニングの目的は、「プラスミンを切断し、そのプラスミン活性を消失させ得るアンジオスタチン様分子を産生する酵素が癌の進展に対する生体側の防御機構として備わっている筈」との仮説を証明することである。この低pH条件でのみ作用する酵素こそが前記仮説における「酵素」である可能性が高く、本願発明者らは新たに当該酵素の単離精製を開始した。

なお、Gately らは最近、前述のP A C Eの本態を単離することに成功し、これらがプラスミンと遊離のシステインドナーに起因する結果であることを報告し

た(Gately S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 94, p. 1068-1087 (1997))。

#### 本願発明の酵素の探索

5 本願発明の酵素の最大の特徴は、プラスミノゲン及びフィブロンネクチン等の血漿蛋白質の限定部位を特異的に切断する能力である。本願発明者らは先ず当該酵素の癌細胞との関係を明らかにする目的で当該酵素の探索及びその単離に着手した。

本願発明者らは、先ず、プラスミノゲンの断片化率をより高感度に検出するスクリーニング系を構築し、当該スクリーニング系を用い各種のクロマトグラフィーの組み合わせによって目的の酵素が精製できることを明らかにした。本願発明のプラスミノゲン断片化酵素のスクリーニング系の概念図を図2に示した。10 本方法はサンドイッチELISAを応用したものであり、固相化抗体としてプラスミノゲンリジン結合部I (Plasminogen Lysine Binding Site I、以下、「LBS I」という)に対する特異抗体を用い、標識抗体としてミニプラスミノゲン(Mini Plasminogen、以下、「mPlg.」という)に対する特異抗体を使用すること15 を特徴とするものである。既知量のプラスミノゲンに目的の酵素が接触するとプラスミノゲンは断片化され標識抗体が認識する部分が消失することによってELISAの発色値が低下する。この発色の低下をもって酵素活性を評価する方法である。

#### 本願発明の酵素の調製

20 目的の酵素の調製は、PC-3培養上清を出発原料とし、陽イオン交換体、ヘパリンクロマトグラフィー、陰イオン交換体、ゲル濾過、ハイドロキシアパタイトからなる一連のクロマトグラフィー操作によって達成された。最初の陽イオン交換体による処理は、主に夾雑する一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (single chain urokinase-type plasminogen activator; scu-P25 A)を除去する目的で行い、ヘパリンクロマトグラフィーはセリンプロテアーゼ群の除去に用いた。scu-P Aはプラスミノゲンアクチベーターの前駆体でありプラスミンの存在によって活性化され活性型のu-P Aとなり、u-P Aは中性域でプラスミノゲンを断片化するため、所望の酵素の精製に際しては初期に除く必要がある。本願発明の酵素は疎水クロマトグラフィーにより良好な分離を

認める。図3に典型的な疎水クロマトグラフィーのクロマトグラムを示した。白丸は吸光度を、黒丸は酵素活性そして波線はイオン強度を示す。図のように疎水性の異なる2種類の酵素活性がPC-3培養上清中に認められる。このうち、疎水性の高い部分(クロマトグラムの後半)の酵素活性にプラスミノーゲンを特異的に切断し、クリングル1~4を含むプラスミノーゲン断片を産生する酵素活性が認められた。なお、疎水性の低い部分(クロマトグラムの前半)の酵素活性はプラスミノーゲンを非特異的に断片化するものであり、単離精製した結果、カテプシンE (cathepsin E)と相同性が高い蛋白であることが見出された。

本願発明の酵素の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーで分離検討した結果、約50から60 kDa付近で活性が回収される。本願発明の酵素のSDS-PAGEによる解析結果を図4に示した。図のように分子量45 kDaに相当する位置に活性を示すバンドが認められた。なお、次項で記述するように本願発明の酵素がアスパラギン酸酵素であることが判明したことから、本願発明の酵素は最終的にペプスタチンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

本願発明の酵素の調製に関しては、上述のPC-3培養上清からの調製のほか、遺伝子組換え技術により当該酵素産生細胞を構築し、これより産生される当該酵素を調製する方法、即ち、当該酵素をコードする遺伝子を好適なベクター等を用いて原核細胞、真核細胞、ほ乳動物細胞または昆虫細胞等適当な宿主に導入し、これより調製する方法も現実的な調製手段として十分に考慮され得る。

#### 本願発明の酵素の性状

本願発明の酵素の阻害様式を図5にまとめた。各種インヒビターの濃度はアプロチニン(0.3  $\mu$ M)、ベンツアミジン(10 mM)、エラスチナル(100  $\mu$ M)、ペプスタチンA(1  $\mu$ M)、EDTA(10 mM)である。図に示されるように本酵素活性はアスパラギン酸酵素の特異的阻害剤であるペプスタチンAによって完全に阻害された。また、図6は反応時のpHを中性域、酸性域に調整した際のプラスミノーゲンの断片化を示したものであるが、図のように本願発明の酵素は酸性域でのみプラスミノーゲンを断片化する。図中矢印A( $\rightarrow$ A)はGatelyらが示したPC-3由来のアンジオスタチンを、矢印B( $\rightarrow$ B)はPACE4によって産生さ



れたプラスミノーゲンクリングル1～4を含む断片に相当する。図7には本願発明の酵素によるプラスミノーゲンの切断部を示した。プラスミノーゲンはA(プラスミノーゲンクリングル1～4部分)、B(ミニプラスミノーゲン部)及びC(ミニプラスミノーゲン断片化部分)に切断され、各画分のN末端アミノ酸を解析した結果、AはF-74、BはP-452そしてCはA-700であった。

本願発明の酵素はプラスミノーゲンのN末端から451番目のロイシンと452番目のプロリン間(以下、「451L-P」と表記する)を切断し、かつN末端73番目のロイシンと74番目のフェニルアラニン間(以下、「73L-F」と表記する)を切断することによってプラスミノーゲンのクリングル1～4部を含む断片を遊離する。なお、生体中に循環するプラスミノーゲンはそのN末端がGluで始まる完全型であるが、そのうち数%が一部断片化を受けている。この断片化された分子種はN末端が78Lysで始まりLysプラスミノーゲンと呼ばれる。本願発明の酵素は完全型のプラスミノーゲンのほかにも、Lysプラスミノーゲンを良好な基質として断片化するため、遊離されるクリングルのなかにはそのN末端アミノ酸残基が78Lysである場合もある。

さらに、本願発明の酵素はクリングル1～4部を含有するアンジオスタチンを産生するとともに、プラスミンの活性中心付近(699番目フェニルアラニン-700番目アラニン間)を切断し、プラスミンの活性を消失させることができる。この切断様式は癌の進展を有効に抑制する上で極めて興味深い点である。即ち、癌の増殖を抑制するアンジオスタチンはプラスミノーゲンの断片化によって生ずると考えられるが、同時に産生される残りのプラスミン活性中心部分(プラスミンセリンプロテアーゼドメイン)が癌の進展を助長する可能性があるからである。また、前述したように、プラスミン活性は血管新生及び癌の浸潤を亢進するが、このクリングル部を除くことはその進展をさらに悪化させる可能性がある。なぜなら、クリングル部が失われることによって生体内に存在するプラスミン阻害蛋白質の作用が減弱してしまうからである。すなわち、プラスミンの阻害蛋白質であるアルファ2プラスミンインヒビター(以下、 $\alpha 2$ -PI)の作用抑制がこれにあたる。血漿中のプラスミンは血流を巡回する $\alpha 2$ -PIによって即座に不活化されるが、この過程において、クリングル部はプラスミンと $\alpha 2$ -PIとの結

合において重要である。この部分の欠落は $\alpha 2-P I$ の作用を半減させるため、阻害を受けない活性型のプラスミン断片が拡散によって癌周辺のマトリックスの分解酵素に作用し、癌の進展・転移増殖を促進する可能性があるからである。

本願発明の酵素は、プラスミノーゲンのクリングル1～4部分を産生するとともに、残存するプラスミン活性を消失させる点が他に報告されているアンジオスタチン産生酵素とは異なる点であり、本願発明の酵素が例えば生体保護の役割を果たしているとするれば、最も有力視される酵素候補である。図8に本願発明の酵素によるプラスミノーゲンの経時的な切断と残存プラスミン活性との関係を示した。(A)はプラスミノーゲンをPACE 4で断片化した際のSDS-PAGEを、(B)は同被検試料のプラスミン活性を測定したものである。図で示されるように切断とともにプラスミン活性が失われるのが理解される。上述の結果は、本願発明の酵素が生体に有利に作用することを示唆するものであり、この点に着目すれば、本願発明の酵素が作用する基質蛋白質はプラスミノーゲンに限らないことが予想される。本願発明者らは、この可能性も同様に明らかにするため、次項以下に示す血漿蛋白質についても同様に断片化を実施し、本願発明の酵素でプラスミノーゲンと同等あるいはそれ以上の活性を有する断片を調製することに成功した。

#### 本願発明の酵素の同定

精製された酵素標品をSDS-PAGEによる電気泳動を行った後、GVDF膜にトランスブロットした。トランスブロット後の膜はアミドブラックで染色後、それぞれ45 kDaに相当するバンド部分を切り出し、アミノ酸配列分析装置でN末端からの配列を解読した。その結果、45 kDaに相当するバンドの配列はLVRIPLHKFTであった。得られたアミノ酸配列を既存のアミノ酸データベースで照合した結果、当該酵素のN末端アミノ酸残基はヒトカテプシンD前駆体に相同することが判明した。また、イムノブロットの手法を用いて精製した酵素を抗ヒトカテプシンD抗体で反応させた結果、当該酵素はこの抗体に反応したことから、本酵素がヒトカテプシンD前駆体に高い相同性を示すことが推察された。

カテプシンDは、全アミノ酸を有するカテプシンD前駆体の状態で産生され、

リソゾーム中で他の酵素によって切断を受け、活性型のカテプシンDに変換される。ヒト乳癌に代表される悪性腫瘍がカテプシンD前駆体を細胞外へ放出することは数多く報告されているが、仮に本願発明の酵素がカテプシンD前駆体であったとしても、カテプシンD前駆体が前駆体の形態でプラスミノーゲンを切断することについては全く新しい知見であり興味ある点である。

5       P A C E 4 調製の出発材料として用いたP C - 3 細胞から調製したm R N A を基に合成したc D N A を用い、カテプシンDのc D N A 配列より全長の翻訳領域を増幅するためのセンスとアンチセンスプライマーを合成し、AmpliTaq (PERKIN ELMER 社)を用いて増幅後、TA cloning kit (Invitrogen 社)を使用し増幅したc  
10       D N A 断片をプラスミドベクターにクローニングした。得られた遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、既知のカテプシンDの塩基配列と同一であることが確認できた。しかし、P A C E 4 をカテプシンD前駆体と同定した場合、非活性型である前駆体がなぜ例えばプラスミノーゲンを切断できるのか、あるいは元来細胞内酵素であるカテプシンがなぜ細胞外に放出されるのか、という疑問が生じる。  
15       本願発明の酵素が真にカテプシンD前駆体と同一であるか否かという点については全アミノ酸配列、構造が明らかにされることが必要である。しかし、現時点においてカテプシンD前駆体、活性型カテプシンD共に本願発明の酵素活性を有するものであり、いずれもP A C E 4 の範疇に入る。また、同様に欠失、置換または化学修飾されたカテプシンD誘導体も、使用目的が癌転移増殖抑制作用を有する  
20       血漿蛋白断片を調製する目的であれば、本願発明の酵素の範疇に入るものである。

#### P A C E 4 で切断した蛋白断片の調製法

25       プラスミノーゲンをP A C E 4 と一定割合で混合し、p H 4 . 0 の条件下で反応させる。中性域の緩衝液で透析後、反応液をリジンセファロースに吸着させてリジン結合の有無により分離することによって、プラスミノーゲンのクリングル1 ~ 4 を含む画分を調製することができる。本断片は炭酸アンモニウム緩衝液で透析後、凍結乾燥する。なお、フィブロネクチンも同様に切断し、断片混合液をヘパリンセファロースで分離することによって所望の断片を調製することができる。

### P A C E 4 の使用方法

#### 1. P A C E 4 で切断した蛋白断片を転移増殖巣増殖抑制剤として使用する方 法

上述の方法で調製した蛋白断片を生理食塩液で溶解し、これを動物試験の試料  
とした。転移増殖巣増殖抑制効果を判定する系としては、マウスに転移増殖性癌  
を移植し、遠隔転移増殖巣の状況を把握する系を用いた。マウスの背部皮下に肺  
癌細胞(LL/2; 大日本製薬) を移植し、原発巣が所定の大きさになるまで飼育  
した後、原発巣を術的に取り除き、1 mg/匹/日でマウス腹腔に試料を10日間  
投与した。なお、対照は凍結乾燥試料を溶解する際に用いた生理食塩水を同量投  
与するものとした(転移増殖巣増殖抑制試験)。

転移増殖抑制試験の場合には原発巣除去後、さらに一定期間飼育した後、1 mg/匹/日でマウス腹腔に試料を10日間投与した。

各試験終了後、マウスを解剖し、転移増殖抑制試験の場合は肺表面の結節数を、  
転移増殖巣増殖抑制試験の場合は肺重量を測定し、対照群と比較した(Mann  
Whetney U検定)。転移増殖抑制試験の結果、対照群の転移増殖結節数が $6.3 \pm 0.2$  g (n=6)であるのに対して、プラスミノゲン断片投与群の転移増殖  
結節数は $2.1 \pm 0.8$  g (n=6)であり、プラスミノゲン断片の投与により癌  
転移増殖を抑制していることが判明した。また、転移増殖巣増殖抑制試験では対  
照群の肺重量が $0.44 \pm 0.28$  g (n=6)であるのに対して、プラスミノゲ  
ン断片投与群の肺重量は $0.23 \pm 0.08$  g (n=6)であり、プラスミノゲン  
断片投与群が有意にLL/2の肺転移増殖後の増殖を抑制することが認められた。

以上の結果は、転移増殖の抑制と血管新生の阻害による結果と推察され、とり  
わけ転移増殖の抑制については、当該断片によるマトリックス分解酵素活性化の  
阻害、プラスミンの競合阻害によるプラスミン作用の抑制、およびレセプターを  
介したマトリックス分解酵素のダウンレギュレーションなど直接的、間接的に転  
移増殖を抑制した結果と考えられる。一方、血管新生の効果については本願発明  
の酵素が断片化するプラスミノゲン断片がO'Reilly らの報告したアンジオス  
タチン及びプラスミノゲンのクリングルと同等の活性を発現した結果と考えら  
れる。しかし、ウシ大動脈血管内皮細胞を用いた内皮細胞の増殖抑制試験におい

ではその増殖を抑制する結果は得られてはおらず、転移増殖巣の増殖抑制の機序については、現時点では不明である。

## 2. PACE 4 を転移増殖巣増殖抑制剤として使用する方法

調製した PACE 4 自体の転移増殖巣増殖効果を判定する系としては、免疫不全(S c i d)マウスを用いた系を使用した。すなわち、S c i dマウスの背部皮下に肺癌細胞(3 L L ; 東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与)を移植し、原発巣が所定の大きさになるまで飼育した。また、マウスに病態の状況を反映させるため、原発巣の大きさによって、全群を原発巣重量1200 mg 以下群と1200 mg 以上群とに分けた。各群の原発巣を術的に除去した後、さらに各群を3群に分け、PACE 4 の高濃度投与群、低濃度投与群、対照群とし、40  $\mu$  g /匹/日あるいは8  $\mu$  g /匹/日でマウス腹腔に試料を10日間投与した。なお、対照は凍結乾燥試料を溶解する際に用いた生理食塩水を同量投与するものとした。

試験終了後マウスを解剖し、肺重量を測定し、対照群と比較した(Mann Whetney U検定)。その結果、興味深いことに原発巣1200 mg 以上群(図中B)において、本願発明の酵素による転移増殖巣増殖抑制活性が濃度依存的に認められた(図9)。

上述の結果は極めて興味深い知見である。すなわち、カテプシンD様の本願発明の酵素が生体内で作用するということは、少なくともpH5.0という低pH環境が生体内に存在することを意味するからである。このpH5.0以下という環境は非生理的であり、この酵素が生理的にどのように作用しているのかは現段階では不明であるが、担癌環境がこの低pH環境を生み出しているとする報告もある。Briozzo らは、本願発明の酵素と同種類に分類されるアスパラギン酸酵素であるカテプシンDが癌細胞から分泌され、遠隔部位で作用し、細胞外マトリックスを分解することを示している(Briozzo P. ら, Cancer Res., vol. 48, p. 3688-3692 (1988))。このことは、間質にアスパラギン酸プロテアーゼが作用できるpH5.5以下のpH域が存在することを示すものである。特に、この低いpHは細胞外マトリックスに近接した悪性腫瘍によって生じた微小環境で認められる。これらのメカニズムに関しては、膜癌蛋白からのプロトンの遊離の増加、

または H-ATPase (Baron R. ら、J. Cell Biol., vol. 101, p. 2210-2222 (1995))、もしくは癌細胞のオリゴサッカライド鎖のシアル酸含量が増加することが原因で (van Beek W. P. ら、Cancer Res., vol. 33, p. 2913-2922 (1973))、細胞膜での酸性側への局在化 (Carrel A. ら、J. Exp. Med., vol. 144, p. 503-521 (1976) に起因するものと考えられる。また、癌の酸性化は無酸素状態の結果であることは従来から提唱されている (Spechler S. J. ら、Arch. Int. Med., vol. 138, p. 1663-1664 (1978))。カテプシン D も本願発明の酵素とともに膜結合能を有する性質から細胞外へ放出される際は膜に包み込まれた状態であることが推察される。カテプシン D 等の細胞内プロテアーゼは主にエンドソーム、リソゾームと呼ばれる膜胞に局在する。両膜胞は H-ATPase の分布により極度に酸性側に傾いており、細胞内外の異物を分解、再利用を果たす役割を有している。癌細胞に何らかの条件が加わることによりこの膜胞が細胞外に放出され、膜胞付近に存在するプラスミノゲンあるいは細胞外マトリックスを細胞外で消化することも推察される。

### 3. PACE 4 によるフィブロネクチン等血漿蛋白の分解

本願発明者らは、癌状態で多く産生され細胞接着に深く関与する血漿成分であるフィブロネクチンに注目し、これを本願発明の酵素で切断した。フィブロネクチンは当該酵素によって限定的に分解され、かつその分解産物にはインタクトの状態では認められない強力な BCE (Bovine capillary endothelial) 血管増殖抑制能力が認められた。当該酵素によるフィブロネクチン分解産物をさらにヘパリンセファロース (ファルマシア社) で分離した画分を上述のマウスを用いたモデル系に投与した結果 (1 mg/kg/日)、これらの断片に転移増殖巣の増殖抑制効果が認められた。本成績は転移増殖巣の増殖を抑制する断片はプラスミノゲンに限らないことを示すものであり、その仮定を証明するため、本願発明者らは、マトリックス構成成分であるテトラネクチンまたはプラスミノゲンが有するのと同様なクリングル部を有する血漿蛋白に本願発明の酵素を作用させ、上述の血管内皮細胞の系でその血管新生阻害活性を評価した。

また、本願発明者らは、血漿蛋白をアルコール分画して得られる幾種かのフラクションを同様に本願発明の酵素で切断した。アルコール画分から透析によって

アルコールを除いた後、さらにクエン酸リン酸緩衝液(pH 4.0)で透析し、蛋白量対酵素比を100:1の割合で当該酵素を混合し、37℃で一晩反応させた。なお、同蛋白粗液はpH 4.0の条件で多くの沈殿を生じるため、酵素反応の前には6000 rpm(トミー社製)で遠心処理をし、その上清を使用した。反応液はさらに50 mM Tris / 50 mM NaCl (pH 7.2)の緩衝液で一晩透析後、0.45  $\mu$ mのフィルター(Milex HA: ミリポア社製)で濾過後、ヘパリンセファロース(Hi-trap Heparin: ファルマシア社製) 5 ml によって蛋白混合液を得た。現段階では活性のみであるが、本願発明者らは既に、アルコール画分のうちフラクションIIIまたはフラクションIVを切断し、このうちヘパリン担体に結合する画分に血管内皮細胞の増殖を抑制する活性を認めている。

#### 4. 癌患者血漿中のPACE 4の測定

癌患者血漿中のPACE 4の活性は、PC-3培養上清中のPACE 4活性を測定する方法に基づいて測定した。披検試料を測定するに当たり、各種癌細胞の培養上清中に放出される酵素活性を上述のプラスミノゲン分解活性で検討した結果、PACE 4は正常細胞では殆ど細胞外へ放出されることがなく、ある種の癌細胞で多量に放出されるのが特徴であることが見出された(図10)。図10中で、(A)はSDS-PAGE、(B)は抗プラスミノゲン抗体を用いたウェスタンブロット、(C)はPACE 4の阻害剤と共に反応させた際のSDS-PAGE、(D)はシステイン酵素阻害剤と共に反応させた際のSDS-PAGEを示す。また、PLGはプラスミノゲン(対照)、NKL Fは平滑筋細胞、HUV ECは血管内皮細胞、PC-3は前立腺癌細胞、Hep G 2は肝癌細胞、COLONは大腸癌細胞、MCF 7は乳癌細胞、LL/2はマウス肺癌細胞の例示を意味する。PACE 4活性は正常細胞では認められず、前立腺癌、大腸癌、肺癌細胞で大量に産生されていることが判明した。また、肝癌細胞はPACE 4とは異なるアスパラギン酸酵素が存在していることが判明した。また、乳癌細胞にPACE 4活性は認められなかった。

上記の知見は、本酵素活性の測定が癌状態を把握するうえで重要なマーカーとなる可能性を強く示唆している。本願発明者らは癌患者血漿のPACE 4活性をPACE 4スクリーニング系に適応させ、その活性値を測定した。癌患者血漿中

の当該酵素活性は $0.73 \pm 0.6 \text{ unit (n=30)}$ であり、健常人の $0.02 \pm 0.1 \text{ unit (n=6)}$ に比較して有意に高値であることが判明した。

5 上述の方法で調製された酵素あるいは当該酵素によって断片化された抗癌能力を有する蛋白断片は、その活性を最大限に維持するためには、新鮮状態で使用する  
るか、保存する場合は $4^{\circ}\text{C}$ で保存し、保存後7日以内に使用することが望ましい。  
あるいは、これらをヒトアルブミン、ゼラチン、塩、糖またはアミノ酸等の好適な安定剤と共に凍結乾燥もしくは液状の状態で保存することができるし、さらには凍結し保存することも可能である。また、感染性夾雑ウイルスの不活性化を目的として、凍結乾燥状態において所定の条件下、例えば $65^{\circ}\text{C}$ にて96時間加熱  
10 処理を施すことは、薬剤の安全性の観点から好ましい態様である。本願発明では、かかる有効成分としてのPACE4または当該酵素によって調製される抗癌能力を持つ蛋白断片を公知の適当な賦型剤と組み合わせ、公知の方法で本願発明の癌転移増殖抑制剤とすることができる。

本願発明のPACE4またはPACE4によって調製される血漿蛋白断片を本  
15 態とする癌転移増殖抑制剤の有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度等により変動し、最終的には医師の意図により変動するものであるが、例えば一般に成人一人当たり $30 \sim 150 \text{ mg}$ 程度を1～2回に分けて投与することなどが想定される。投与方法は単回大量(ボラス)あるいは静脈点滴投与が最適である。また、場合により他の抗癌剤と併用することも可能であり、本願発明  
20 によって提供される癌転移増殖抑制剤中に前記の抗癌剤を併存させることも好ましい態様の一つである。

なお、本願明細書中の実施例で使用した血液由来のプラスミノゲン断片に関しては、マウスでの単回静脈投与毒性試験、呼吸器循環器系に及ぼす影響をビーグル犬を用いて実施する一般薬理試験及びウイルス不活性化試験等によりその安全性が確認されている。  
25

#### 本願発明の効果

本願発明の血漿蛋白断片化酵素または当該血漿蛋白断片化酵素によって調製される血漿蛋白断片を主成分とする癌転移増殖抑制剤は、肺癌、大腸癌に代表される固形癌等の臨床治療に利用され得る。



ヒトプラスミノーゲンをエラスターゼで処理することによって得られるヒトアンジオスタチンは、強力に血管内皮細胞の増殖を抑制し、新生血管に依存する腫瘍の増殖を有効に抑制することが O'Reilly らの報告で明らかにされている (O'Reillyら、Nat. Med., vol. 2, p. 689-692 (1996))。血管新生阻害剤による癌治療は従来の化学療法に比較して副作用が少なく、且つ薬剤耐性を受けにくい点で大きな注目を集めている。しかし、一方で血管新生阻害剤は癌が存在する間その投与が続けられる必要があり、特にアンジオスタチンのような蛋白由来物質については、その供給が大きな問題となる。遺伝子組換え技術を用いたアンジオスタチンの調製あるいは癌患者へのアンジオスタチン遺伝子の導入などは、これら問題の解決手段として注目されているが、PACE 4 の癌患者への導入もこの問題の解決策または治療法の一つとなり得る。

即ち、1. アンジオスタチンの原料であるプラスミノーゲンは生体内に大量に存在するため、本願発明の酵素は少量で有効にプラスミノーゲンからアンジオスタチンを調製することが可能である。2. アンジオスタチンを産生させると共に、癌進展に促進的に作用するプラスミンを不活性化させることにより、より有効にアンジオスタチンの活性を発現させることができる。3. 本願発明の酵素は外分泌系(胃)を除く中性の pH に保たれた生体内では作用せず、その作用は PACE 4 がその活性を発現する低い pH 域を有する癌周辺に限局されるため有効であり、かつ安全である。また、4. 本願発明の酵素はプラスミノーゲンに限らず、フィブロネクチンあるいはテトラネクチンを切断し血管新生阻害作用を有する断片を遊離させる。5. それゆえ、その相乗的作用によってより有効に血管新生に依存する癌の転移増殖を抑制することができる。

以下、本願発明の理解を深めるために実施例に沿って説明するが、本願発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

#### 25 実施例 1 (酵素原液の調製)

ヒト前立腺癌細胞(PC-3)は九州大学医学部、桑野伸信教授より供与された。PC-3 は 10% ウシ胎児血清(FCS)を含む RPMI-1640 培地(日水製薬社製)で維持し、コンフルな状態になった時点で、その培地を FCS を含まない RPMI-1640 (以下、「無血清培地」という)に置換し、1~2 日間培養後、

その培養上清を回収し、遠心(3 0 0 0 r p m×2 0 分間)、濾過(0.4 5 μ m Milex HA:ミリポア社製)処理したものを酵素原液とした。

#### 実施例 2 (酵素活性の確認)

5 酵素原液の活性は、Gately らの方法に従い、酵素原液とプラスミノーゲンとを反応させ、その反応液を SDS-PAGE で分離後、抗 LBS I 抗体を用いたイムノブロットでプラスミノーゲンが分解されている度合いを確認することによって評価した。

#### 実施例 3 (培養上清のプラスミノーゲン断片化に対する pH の影響)

10 実施例 1 の培養上清 1 0 0 μ l、1 m g / m l のプラスミノーゲン溶液 1 0 0 μ l、及び各種 pH 緩衝液を 1 : 1 : 2 の割合で混合し、3 7℃でインキュベーションし、酵素活性を実施例 2 に記載の方法で確認した。結果を図 1 に示した。図で明らかなように pH 5. 0 を境にプラスミノーゲンの断片化様式に差が認められた。矢印(→)は Gately らが報告した PACE 由来のプラスミノーゲン断片に相当する。

#### 15 実施例 4 (PACE 4 により生ずるプラスミノーゲン断片の同定)

実施例 3 に記載の検体のうち pH 4. 0 に相当する反応液について 1 2. 5 %の SDS-PAGE を実施し、常法に従い、蛋白をイモビロン膜 (ミリポア社製) に転写した。これにウサギ抗ヒトプラスミノーゲン Lysine Binding Site I 抗体、ウサギ抗ヒトプラスミノーゲンミニプラスミノーゲン抗体を用いてイムノブ  
20 ロットを行った結果を図 1 1 に示した。図のように非還元型の泳動で 3 本のバンドが認められ、このうち 4 0、4 3 k D a のバンドはウサギ抗ヒトプラスミノーゲン Lysine Binding Site I 抗体に、3 5 k D a のバンドはウサギ抗ヒトプラスミノーゲンミニプラスミノーゲン抗体にのみそれぞれ反応した。図中、(a) はリジンセファロース結合画分、(b) はリジンセファロース素通り画分である。

#### 25 実施例 5 (pH 4. 0 条件での切断様式)

実施例 3 の条件でプラスミノーゲンを断片化した検体を 1 2. 5 % SDS-PAGE 電気泳動を実施し、常法に従い、蛋白をイモビロン膜 (ミリポア社製) にトランスブロットした。その後、アミドブラックで染色後、精製水で脱色し、約 4 0、4 3 k D a のバンドと 3 5 k D a 付近のバンドをそれぞれ取り出した。各バ

ンドについて、アミノ酸N末分析機(Bio Applied 社製)によってそのアミノ末端アミノ酸残基を求めた。得られた蛋白質のN末端アミノ酸残基は40、43 kDaのバンドは79 Leuであり、35 kDaに相当する部分は480 Proであった。pH 4.0条件で切断される本断片はその分子量からクリングル1~4を含む断片であることが推察された。本断片を以下PAN 4 (PACE derived Angiostatin pH 4.0)と略称する。

#### 実施例6 (各種癌細胞のPACE 4の産生)

実施例1のPC-3の代わりにヒト繊維芽細胞、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞、ウシ大動脈血管内皮細胞、ヒト肝癌細胞(He p G 2)、マウス肺癌細胞(LL/2)の培養上清を用い、実施例3の方法に従いプラスミノーゲンの断片化を調べた。PC-3培養上清以外の癌細胞にも同様の断片化酵素が認められた。

#### 実施例7 (PACE 4のスクリーニング系)

PACE 4のスクリーニング法の概念を図2に示した。固相抗体として抗ミニプラスミノーゲン抗体を用い、標識抗体としてプラスミノーゲンのクリングル1~3に反応する抗体を用い、既知量のプラスミノーゲンと試料を反応させた液をこの測定系に加える。クリングル4からミニプラスミノーゲン間で切断があった場合、その発色値はその程度に従って低下する。この低下の率を評価することによって酵素量を決定する。

##### (1) 試料の調製

750  $\mu$ lの0.1 Mリン酸/クエン酸緩衝液(pH 3.0)に200  $\mu$ lの検体(培養上清または精製中間原料)を加え、これに最終濃度20  $\mu$ g/mlのプラスミノーゲンまたはLys プラスミノーゲン50  $\mu$ lを添加し、37°Cで1時間反応させた。反応液は、20 U/ml アプロチニン、1% BSAを含むリン酸緩衝液で希釈し、これをELISAの試料とした。

##### (2) ELISAの操作

リン酸緩衝液からなる抗体希釈液に抗ヒトLBSI抗体を20  $\mu$ g/mlになるように溶解し、これを96 ウエルマイクロタイタープレート(IMMUNO MODULE MAXISORP F8、ヌンク社製)に1 ウエルあたり100  $\mu$ lずつ添加し、4°Cで一晩放置した。各ウエルより上記抗体液をマイクロタイタープレート洗浄機(DIATECH

社製, ULTRA WASH II)で吸引除去し、PBSで洗浄した後、1%アルブミン (Albumin Fraction V, Bovine、生化学工業社製)溶解液を300  $\mu$ l添加し、4℃で一晩放置した。アルブミン溶液を吸引除去し、前記緩衝液で3回洗浄し測定用ウェルとした。別に、ペルオキシダーゼ標識した抗mP1 g.抗体を0.05%の Tween 20 を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した溶液(20 ng HRP conjugate/ml)を準備した。測定用ウェルに上記の方法で調製した試料を1ウェルあたり100  $\mu$ l入れ、37℃で1時間放置し反応させた。各ウェル中の反応液を吸引除去し、0.05%の Tween 20 を含むPBS(pH 7.2)で4回洗浄後、ペルオキシダーゼで標識した抗mP1 g.抗体溶解液を100  $\mu$ l入れ、37℃で30分間放置し反応させた。各ウェルの反応液を吸引除去し、0.05%の Tween 20 を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で4回洗浄後、基質液(OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100  $\mu$ lを各ウェルに添加後、20分間室温遮光下で放置した後、2N硫酸を各ウェルに100  $\mu$ lずつ加え反応を停止し、プレートリーダー(WAKO Molecular Devices, THRM0 max microplate reader)で490 nmの吸光度を測定した。

#### (ELISAの結果)

PC-3培養上清の希釈系を本願発明の酵素測定系で測定した結果を図12に示した。図12の上図白丸は基質にプラスミノーゲンを用いたもの、黒丸はLysプラスミノーゲンを用いたものである。PC-3培養上清中のプラスミノーゲン断片化酵素は経時的に両基質を切断した。図に示されるように、反応初期においてLysプラスミノーゲンが早期に切断される傾向が認められたが、10分以降GluプラスミノーゲンとLysプラスミノーゲンの切断の差は減少することが判明した。図12の下図はプラスミノーゲンが切断されていく様子を電気泳動図を用いて示したものである。

以上の結果はPACE 4は一旦ミニプラスミノーゲン部を切断した後、クリンゲル部を析出することを示しており、基質としてはGlu、Lysのどちらのタイプのプラスミノーゲンでもその測定値は同一であることを示す。本願発明者らは便宜上、本測定系の基質をLysプラスミノーゲンに固定し、酵素活性はこのLysプラスミノーゲン10  $\mu$ gを1分間に分解する酵素量を1単位として定義した。

### 実施例 8 (プラスミノーゲン分解酵素の精製)

本願発明の酵素(PACE 4)は、疎水クロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過及びハイドロキシアパタイトの各種クロマトグラフィーを組み合わせることによって精製した。

- 5 実施例 1 の方法で得られた酵素原液 5 L を 50 mM Tris 緩衝液(pH 7.4)で 2 倍に希釈後、50 mM Tris/50 mM NaCl (pH 7.4)緩衝液で平衡化した CM-Sepharose 6B( $\phi$  5 × 150 mm、ファルマシア社製)に通液し、さらに同緩衝液で平衡化したヘパリン-Sepharose 4B( $\phi$  2.5 × 100 mm、ファルマシア社製)に通液し、PACE 4 の粗精製溶液を調製した。得られた粗精製溶  
10 液に 1 M の硫酸アンモニウムを加えて一晩静置した後、4℃で 6,000 rpm の遠心処理を行いその遠心上清を得た。

- 遠心上清をさらに 25  $\mu$ m の孔サイズを有する濾紙(AP-25: アミコン社製)で濾過し、濾液を 1 M の硫酸アンモニウムを含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で平衡化した Phenyl-Sepharose Hiperformance ( $\phi$  2.5 × 100 mm、  
15 ファルマシア社製)で処理し、同緩衝液で洗浄後、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で濃度勾配溶出した。その後、さらに 40 %エチレングリコールを含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で溶出した。

- 活性画分(50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)及び 40 %エチレングリコールを含む同緩衝液にて溶出)を集め、同画分を大過剰の 10 mM Tris 緩衝液(pH 7.4)で透析した。透析後、液を 50 mM Tris 緩衝液(pH 7.4)で平衡化した Q-Sepharose Hiperformance ( $\phi$  1.5 × 100 mm、ファルマシア社製)で処理し、  
20 1 M NaCl を含む同緩衝液で濃度勾配溶出した。活性画分を集め、限外濾過膜(YM-10: アミコン社製)で濃縮後、50 mM Tris/100 mM NaCl (pH 7.4)緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200 ( $\phi$  2.5 × 100 cm、ファルマシア社製)に通液しゲル濾過を実施した。分子量 50,000 ~ 60,000 相応付近に溶出されるピークを分取し、さらに Q-Sepharose Hiperformance ( $\phi$  1.5 × 100 mm、ファルマシア社製)のクロマトグラフィーを上記の条件で  
25 実施して活性画分を調製した。得られた活性画分は最終的に 20 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)で透析した後、同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイト( $\phi$

2.5 × 100 mm、バイオラッド社製)に通液し、200 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)の濃度勾配溶出を用いて精製した。精製した蛋白質は分子量が42~45 kDa (還元型)に相当するバンドとして認められた。精製後のSDS-PAGEを図4に示した。PACE 4は分子量42~45 kDa (還元型: 試料をメルカプトエタノールで処理したもの)の蛋白質として認められた。

(PACE 4のN末端アミノ酸残基の分析および同定)

PC-3培養上清より調製した本願発明の酵素はGVDF膜(イモビロン、ミリポア社製)にトランスブロットしたものをアミノ酸シーケンサー(Applied Biosystem Model 477A protein sequencer)で分析した。当該酵素のN末端アミノ酸分析の結果はLVRLPLHKFTでありホモロジー検索の結果、ヒトカテプシンD前駆体(Human Cathepsin D precursor)のそれと一致した。

#### 実施例9 (本願発明の酵素によるプラスミノーゲン断片の調製)

本願発明の酵素によるプラスミノーゲン断片の調製は、Lysプラスミノーゲンと本願酵素をインキュベーションした後、反応液をリジンアフィニティークロマトグラフィーで分離することによって調製した。50 mM Tris/0.15 M NaCl (pH 8.0)からなる緩衝液中にLysプラスミノーゲンと本願酵素が100:1の割合になるように混合した後、37℃で3時間反応させた。反応液は同緩衝液で平衡化したLysine Sepharose 4B (φ10 × 15 mm)に通液し、洗浄後、0.1 Mイプシロンアミノカプロン酸を含む同緩衝液で溶出した。また、プラスミノーゲンをを用いた場合の断片の調製に関しては、37℃で一晩反応させ、以下同様に操作した。得られた画分は0.1 M炭酸アンモニウムで透析した後凍結乾燥し、使用時まで-80℃で保存した。

#### 実施例10 (本願発明の酵素によって生成したプラスミノーゲン断片)

本願発明の酵素により生成したプラスミノーゲンクリングル1~4を含むプラスミノーゲン断片を12.5%のSDSポリアクリルアミドで電気泳動し、クマシー染色した結果を図13に示した。2-メルカプトエタノールで処理した(還元型)プラスミノーゲン断片について、55 kDaと63 kDaの分子量に相当する2本のバンドが認められた。また、2-メルカプトエタノールで処理していない(非還元型)プラスミノーゲン断片は還元型の分子種に相当する40 kDaと4

3 k D a にわたる 2 本のバンドが認められた。

得られたプラスミノーゲン断片について、その N 末端アミノ酸残基を分析した。  
L y s プラスミノーゲンを基質とした場合およびプラスミノーゲンを基質とした  
場合の N 末端アミノ酸残基はともに 7 7 L y s であった。

5 実施例 1 1 (免疫不全動物を用いた P A C E 4 の抗癌増殖抑制作用)

1. 癌細胞

ルイス肺癌細胞 (L L / 2) は大日本製薬より購入し、ルイス肺癌細胞 (3 L L)  
は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより分与を受けた。各細胞は 1  
0 % F B S を含む R P M I - 1 6 4 0 / H i g h G l u c o s e 培地 (大日本製薬社製) で、  
10 3 7 ° C 、 5 % C O <sub>2</sub> 条件下で維持、培養した。

2. マウス

6 週齢の C 5 7 B 1 マウスは九州動物より購入し、免疫不全 (S c i d) マウス  
はチャールズリバー社より購入した。各動物とも、4 ~ 5 匹 / ケージで 1 週間、  
無菌施設で馴化し飼育した後に実験に供した。

15 6 週齢の免疫不全マウスにルイス肺癌細胞 (L L / 2) を 1 0 <sup>6</sup> 細胞、背部皮下  
に移植し、1 4 ~ 1 7 日間飼育して形成される背部の癌 (原発巣) を術的に切除し、  
その原発巣の大きさを基に 2 群に分類した。原発巣 1 2 0 0 m g 以下群 (原発巣  
2 0 0 m g ~ 1 2 0 0 m g) と 1 2 0 0 m g 以上群 (原発巣 1 2 0 1 m g ~ 2 5 0  
0 m g) をそれぞれ 3 群に分け、本願発明酵素 (P A C E 4) 高投与群、本願発明  
20 酵素 (P A C E 4) 低投与群及び対照群とした。術後 4 日飼育後、各々の群に対し  
て P A C E 4 を 1 0 μ g / 匹、2 μ g / 匹及び生理食塩水 1 0 0 μ l で毎日 1 0 日  
間腹腔内投与を行った。その後マウスを解剖して肺の重量を測定した。結果を図  
9 に示した。図中、(A) は原発巣重量 1 2 0 0 m g 以下群への P A C E 4 投与  
を、(B) は原発巣 1 2 0 0 m g 以上群への投与を示す。なお、点線は正常マウ  
25 スの肺重量を示す。図のように 1 2 0 0 m g 以下群においては肺重量で対照群と  
の差異を認めなかったが、1 2 0 0 m g 以上群では P A C E 4 投与の量依存的な  
肺重量の抑制 (転移増殖巣の増殖抑制) 作用が認められた。

実施例 1 2 (P A C E 4 で切断したプラスミノーゲン断片の担癌動物への投与)

6 週齢の C 5 7 B 1 マウスの背部皮下にルイス肺癌 (L L / 2) 細胞を 1 0 <sup>6</sup> 細

胞移植し、14～17日間飼育し、背部の癌(原発巣)が300～1200mgに達した時点で原発巣を術的に切除し、消毒後患部を縫合した。さらにマウスを14日間飼育した後、10日間PACE4で切断したプラスミノゲン断片を25μg/匹で腹腔内投与した。11日目にマウスを解剖して肺を摘出し、肺の重量を測定した。対照群の肺重量が $0.44 \pm 0.28$  g (n=6)であるのに対して、プラスミノゲン断片投与群の肺重量は $0.23 \pm 0.08$  g (n=6)であり、プラスミノゲン断片投与群が有意にLL/2細胞の肺転移増殖後の増殖を抑制することが認められた。

### 実施例13 (血管内皮細胞増殖阻害試験)

血管内皮細胞増殖抑制試験は Gatelly らの方法に従い、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC; Human Umbilical vein endothelial (HUV) cell、三光純薬)を用いた系で評価した。HUVECは24ウエルプレート(Nuncclone, Nunc社製)に12,500細胞/ウエルで播種し、キットに添付の培養液で一晩培養した後、1、10、50、100μg/mlの当該プラスミノゲン断片(対照としては生理食塩液)を加え、5%CO<sub>2</sub>条件下、72時間、37℃で培養した。トリプシン/EDTA溶液で細胞をウエルから剥離させ、コールターカウンター(コールター社製)で細胞数を計測した。

また、同様に O'Reilly らの方法に従いウシ大動脈血管内皮細胞を用いた系によっても当該プラスミノゲン断片を評価した。ウシ大動脈血管内皮細胞(Bovine aorta endothelial (BAE) cell)は三晃純薬より購入したものを扱い、ゼラチンでコートした24ウエルプレート(岩城硝子社製)上で、10%ウシ胎児血清(FCS)、3ng/ml塩基性FGF(bFGF)、1%グルタミン、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシンを含むDMEM基礎培地中、5%CO<sub>2</sub>の条件で維持培養を行った。24ウエルのゼラチンコートプレートにBAE細胞を12,500細胞/ウエルで播種し、bFGFを除いた基礎培地で24時間培養した後、bFGFを除いた5%FCS含有基礎培地に当該プラスミノゲン断片を100μg/mlになるよう希釈した培養液に交換し、20分間37℃で反応させた。ここで、陰性コントロールとして生理食塩液を、陽性コントロールとしてアンジオスタチン(Angiostatin、テクノクロン社製)を用いた。反応後、5%FCS、



2 ng/ml bFGFを含む基礎培地を加え、37℃で72時間さらに培養した。トリプシン/EDTA溶液で細胞をウェルから剥離させ、コールターカウンター(コールター社製)で細胞数を計測した。

(PACE 4によって調製されたプラスミノゲン断片の血管内皮細胞増殖抑制作用)

PACE 4によって調製されたプラスミノゲン断片を0~20 µg/mlで、上述の血管内皮細胞に作用させたが、当該断片に血管内皮細胞の増殖を抑制する作用は認められなかった。一方、テクノクロン社より購入したアンジオスタチンにはその増殖を抑制する作用が認められた。

#### 10 実施例 14 (PACE 4の *E. coli* による発現(cDNA調製))

PACE 4のN末端分析の結果は実施例8に示したように、lysosome系の蛋白分解酵素であるカテプシンDの前駆体のアミノ酸配列と相同性が高く、カテプシンD自体にもPACE 4と同様の活性が認められたことから、PACE 4の活性の本態はカテプシンDであろうと推定された。この事実から、以下の手法によりPACE 4のcDNAを単離した。

##### 1. ヒト前立腺癌細胞PC-3中のメッセンジャーRNAの精製

ヒト前立腺癌細胞(PC-3)約1600万個からISOGEN液(和光純薬社製)を用い、定法に従って細胞中の全てのRNAを抽出した。この全RNAからoligo(dT)カラムを使用して最終的に27 µgのmRNAを精製した。精製したmRNAは、以下のcDNA合成に使用するまで10倍量の3M酢酸ナトリウムと2.5倍量の冷エタノールを加え、-80℃に保存した。

##### 2. cDNA合成と増幅

精製したmRNA 1 µgからGIBCO BRL社のSuper Script Preamplification Systemを使用し、その手順書に従ってoligo(dT)をプライマーとしてPACE 4のcDNAを合成した。次に、データベース上に公開されたカテプシンD前駆体cDNAの塩基配列より、PACE 4の遺伝子全長翻訳領域を増幅するためのセンスとアンチセンスプライマーを合成し、AmpliTaq(PERKIN ELMER社製)を用いて所望の遺伝子の増幅を行った。

##### 3. PACE 4のcDNA塩基配列の決定

TA cloning kit(Invitrogen 社)を使用し、その手順書に従って増幅した c D  
NA断片をプラスミドベクターにクローニングした。得られたプラスミドを鋳型  
として、蛍光ラベルしたジデオキシヌクレオチドを使用した。ジデオキシターミ  
ネーター法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列とその配列により推定  
5 されるアミノ酸配列を既知のヒトカテプシン D 前駆体と比較した結果、極めて相  
同性の高い配列であることが確認できた。

#### 実施例 1 5 (癌患者血漿中の P A C E 4 活性)

##### 1. P A C E 4 の活性測定の意味

実施例 6 に示したように、P A C E 4 は正常細胞では殆どその細胞外へ放出さ  
10 れることがなく、ある種の癌細胞で多く放出されるのが特徴である。このことは、  
P A C E 4 が癌状態を把握するうえで重要なマーカーとなる可能性を示している。  
前述のように、P A C E 4 はヒトカテプシン D 前駆体と極めて相溶性が高く、P  
A C E 4 に対する抗体はヒトカテプシン D 前駆体及びその活性型であるヒトカテ  
プシンに強く反応する。そのため、一般にヒトカテプシンに対する抗体を用いて  
15 測定された結果は P A C E 4 にも反映させることが可能であり、癌と P A C E 4  
の関係を知るうえで重要な情報である。この関係については、乳癌を対象とした  
報告が最も多く、一般に乳癌状態ではヒトカテプシン D の抗原値が高く、ヒトカ  
テプシン D 量の上昇は乳癌を悪性化するというのが一般的な認識である。しかし、  
実施例 6 に示した結果は、癌の遠隔転移増殖巣の増殖を阻害する癌細胞であるル  
20 イス肺癌や前立腺癌がプラスミノゲンを断片化する P A C E 4 活性を細胞外に  
多く放出するのに対して、乳癌細胞(MF C-7)にはその活性が殆どないことを  
示すものであり、乳癌においてはその抗原値と P A C E 4 活性値に大きな差異が  
認められることが類推された。

P A C E 4 の活性は断片化したプラスミノゲン量を E L I S A で測定するも  
25 のであり、カテプシン D で用いられるヘモグロビンの切断断片の色素を吸光度あ  
るいは蛋白量で測定する方法に比べ約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍高感度である。そのた  
め、血中に微量に存在するカテプシン D 活性は従来の方法では測定することがで  
きない。本願発明者らは、実施例 7 に示した P A C E 4 スクリーニング系を癌患  
者血漿の P A C E 4 活性測定に適用し、その活性値を測定した。

## 2. 癌患者血漿中のP A C E 4 活性

乳癌、肝臓癌、肺癌の各々の癌患者血漿及び正常人血漿を対象として実施例7の方法に従いそのP A C E 4 活性を測定した。

### (1) 癌患者血漿の測定

- 5        マイクロ遠沈管に癌患者血漿100 $\mu$ l、1%EDTAを含む生理食塩液100 $\mu$ l及びpH修正液100 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした。反応液を15,000rpmで3分間遠心処理し、上清を得、これを測定検体とした。測定検体を実施例7に示したP A C E 活性測定用ELISAで測定した。また、正常人血漿100 $\mu$ l、P A C E 4/100 $\mu$ l(0~50unit)、pH修正液100 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションし、以下同様の操作を行い、  
10        得られる測定値で検量線を作成した。なお、本測定では血漿中に存在する内在性のプラスミノーゲンを基質として用いているため、内在量のプラスミノーゲンはプラスミノーゲン定量用ELISAを用いて測定し、一定量とした。

### (2) 結果

- 15        癌患者血漿中の当該酵素活性は $0.73 \pm 0.6$  unit ( $n=30$ )であり、健常人の $0.02 \pm 0.1$  unit ( $n=6$ )に比べ有意に高値であることが認められた。癌の種類別の結果としては、乳癌 $0.66 \pm 0.03$  unit ( $n=6$ )、肝臓癌 $0.69 \pm 0.03$  unit ( $n=8$ )、肺癌 $0.77 \pm 0.04$  unit ( $n=10$ )、その他 $0.70 \pm 0.07$  unit ( $n=13$ )であり、各癌の間で測定  
20        値に差異は認められなかった。

### 実施例16 (P A C E 4による他の血管新生抑制因子の産生)

- フィブロネクチンは Rouslahti らの方法(Method Enzymol. vol. 82, p.803-831)に従い、ゼラチンをリガンドとしたレジンを用い精製した。新鮮凍結血漿500mlを凍結融解して得られる浮遊沈殿物(クリオプレシピテート)を200ml  
25        のPBSで溶解し、同液をさらに4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。引き続き同液を10,000rpmで遠心処理し、澄明感のある沈殿物を得た。沈殿物を室温でPBSで溶解後、ゼラチン Sepharose 4B に通液し、十分に洗浄した後、4M尿素を含むPBSで溶出した。得られたフィブロネクチンはさらに Sephacryl HR500(ファルマシア社製)でゲル濾過を行った後、SDS-PAGEでその純度を確認し、

使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ビトロネクチン、ヒト肝臓細胞増殖因子(HGF)はベクトンディッキンソン社及びカルбиоケム社より購入した。

上述の蛋白質を $0.1\text{M}$ リン酸-クエン酸緩衝液とし、 $\text{pH}$ を $4.0$ に調整後、PACE 4と蛋白質が $200:1$ になるように本願発明の酵素を加え $37^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。反応液に $0.5\text{M}$ のリン酸緩衝液( $\text{pH } 7.0$ )を加えて反応を停止させた後同液をPBSに透析して無菌濾過したものを検体とした。

#### 実施例 1 7 (フィブロネクチンの断片化と血管新生阻害作用)

実施例 1 3の方法で、試験検体をフィブロネクチン及びフィブロネクチン断片に換え、その血管内皮細胞増殖に関わる影響について検討した。図 1 4に各種条件でPACE 4とフィブロネクチンを接触した後の反応液の電気泳動図を示した。図中のレーン 1 は未処理のフィブロネクチンを、レーン 2 はフィブロネクチンを $\text{pH } 4.0$ の条件で12時間反応させた反応液を、レーン 3 はフィブロネクチンとPACE 4を混合し $\text{pH } 4.0$ の条件で12時間反応させた反応液を泳動した結果を示す。また、フィブロネクチンをPACE 4によって断片化した産物を血管内皮細胞に作用させた結果を図 1 5に示した。図のようにPACE 4で断片化していないフィブロネクチンが全くその増殖を抑制しないのに対し、PACE 4で断片化したフィブロネクチン断片は血管内皮細胞の増殖を有意に抑制した。

## 請求の範囲

1. 癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素。
2. 下記の性状を有する請求項1記載の血漿蛋白断片産生酵素：(a)非還元系S  
D S電気泳動で約45kDaの分子量を示し、(b)N末端のアミノ酸残基がLV  
5 R I P L H K F Tであって、(c)pH5.0以下の酸性域で血漿蛋白に作用して  
癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片を産生し、そして(d)カテプシンD前  
駆体と高い相同性を示すアスパラギン酸酵素である。
3. 前記被断片化血漿蛋白が、プラスミノゲン、フィブロネクチン、ビトロネ  
クチン及びヒト肝細胞増殖因子(HGF)より選択される、請求項1または2記載  
10 の血漿蛋白断片産生酵素。
4. プラスミノゲンの73L-74F及び/または451L-452P間の結  
合を切断し、プラスミノゲンのクリングル1~4を含む断片を遊離させ得る、  
請求項1~3のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素。
5. 請求項1~4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素の作用によって産生  
15 される癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片。
6. プラスミノゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン及びヒト肝細胞増殖  
因子(HGF)より選択される血漿蛋白に由来するものである請求項5記載の血漿  
蛋白断片。
7. プラスミノゲンのクリングル1~4を含む断片よりなる請求項5または6  
20 に記載の血漿蛋白断片。
8. フィブロネクチンヘパリン結合部を含む断片よりなる請求項5または6に記  
載の血漿蛋白断片。
9. 血漿成分に請求項1~4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を作用さ  
せることを特徴とする、癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片の調製方法。
10. ヘパリン担体を利用したレジンを用いて癌転移増殖抑制作用を有する血漿  
25 蛋白断片を特異的に分離する工程を含む、請求項9記載の方法。
11. 請求項1~4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を主たる構成成分  
とする、癌(固形癌)、糖尿病性網膜症、リウマチ等血管新生に関与する病態の  
治療及び予防用薬剤。

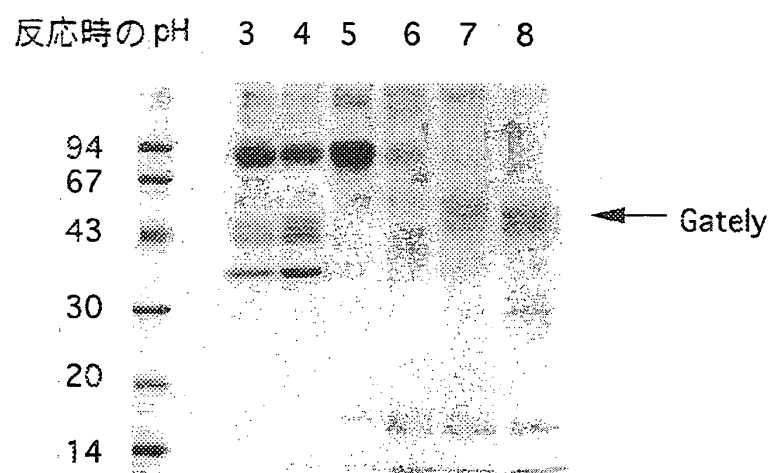
1 2. 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を主たる構成成分とする癌の治療及び予防用薬剤。

1 3. 請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の血漿蛋白断片を主たる構成成分とする、癌(固形癌)、糖尿病性網膜症、リウマチ等血管新生に関与する病態の治療及び

5

1 4. 請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の血漿蛋白断片を主たる構成成分とする癌の治療及び予防用薬剤。

図 1

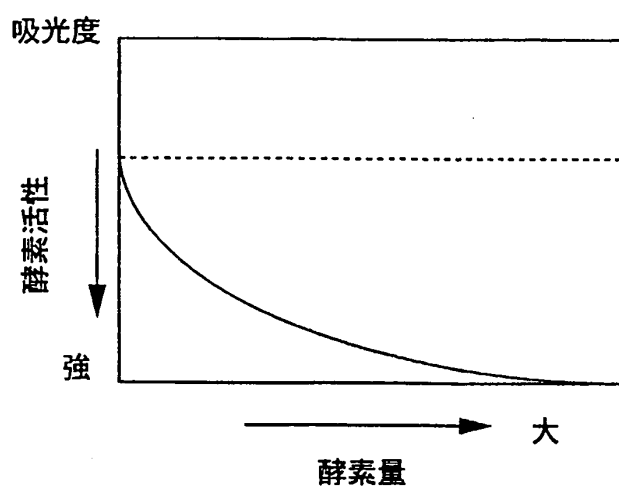
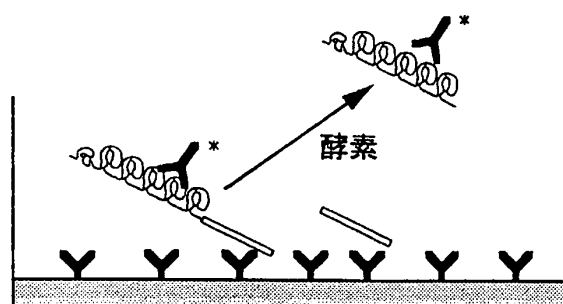
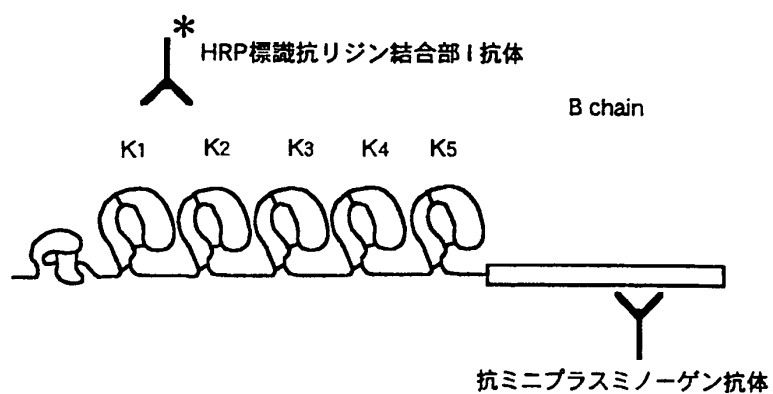






2/16

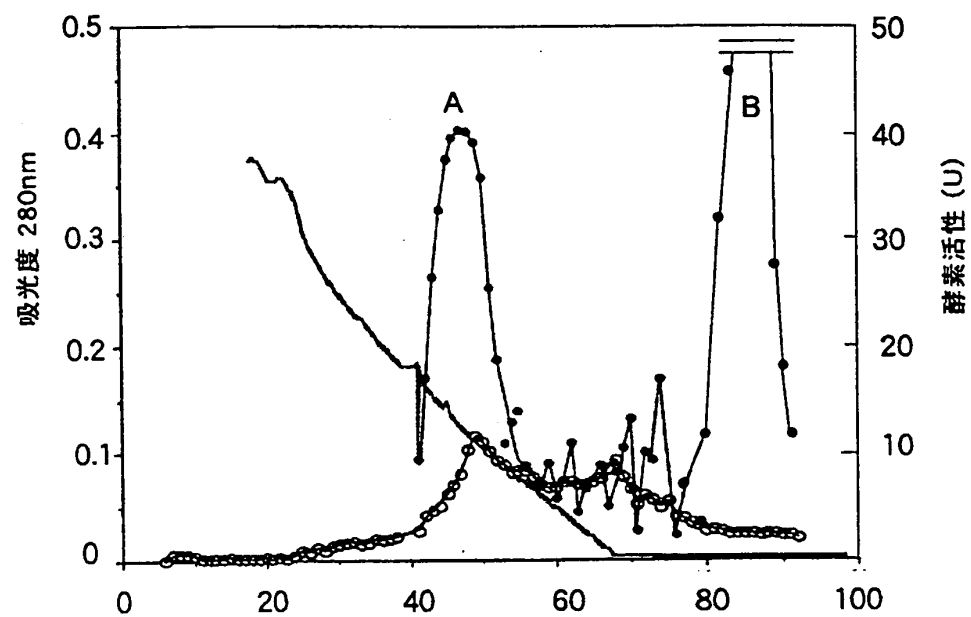
図 2





3/16

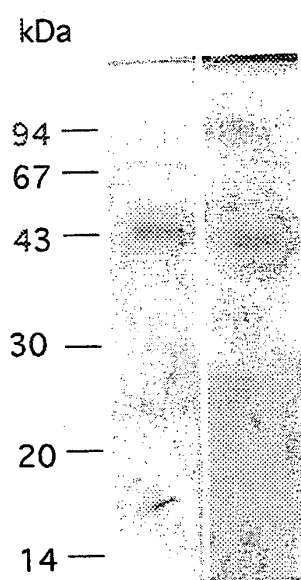
図 3





4/16

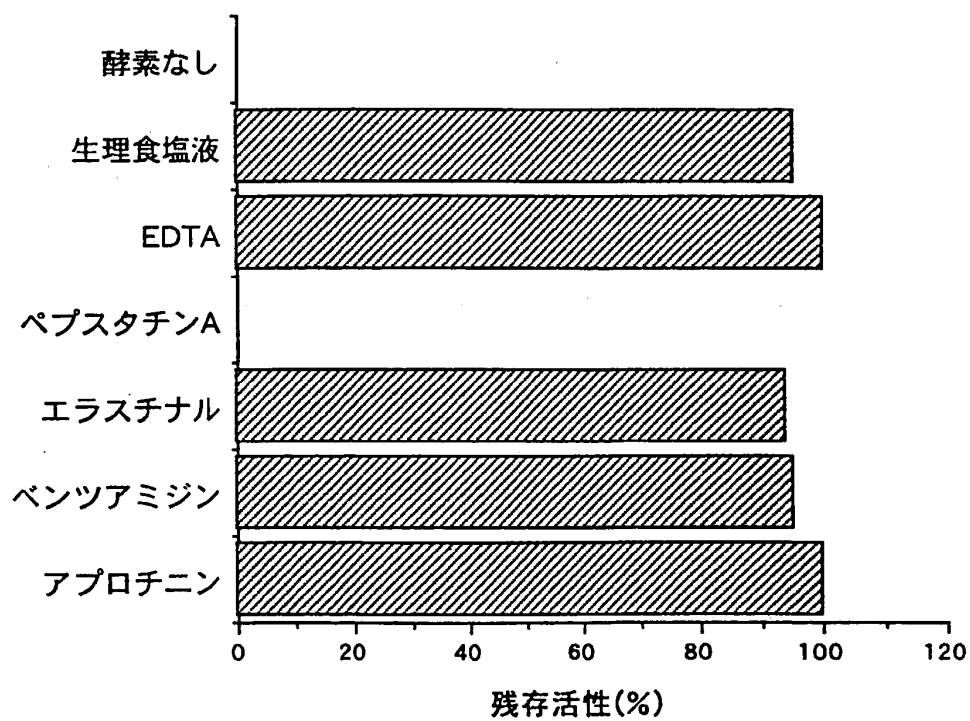
図 4



還元型 非還元型



図 5

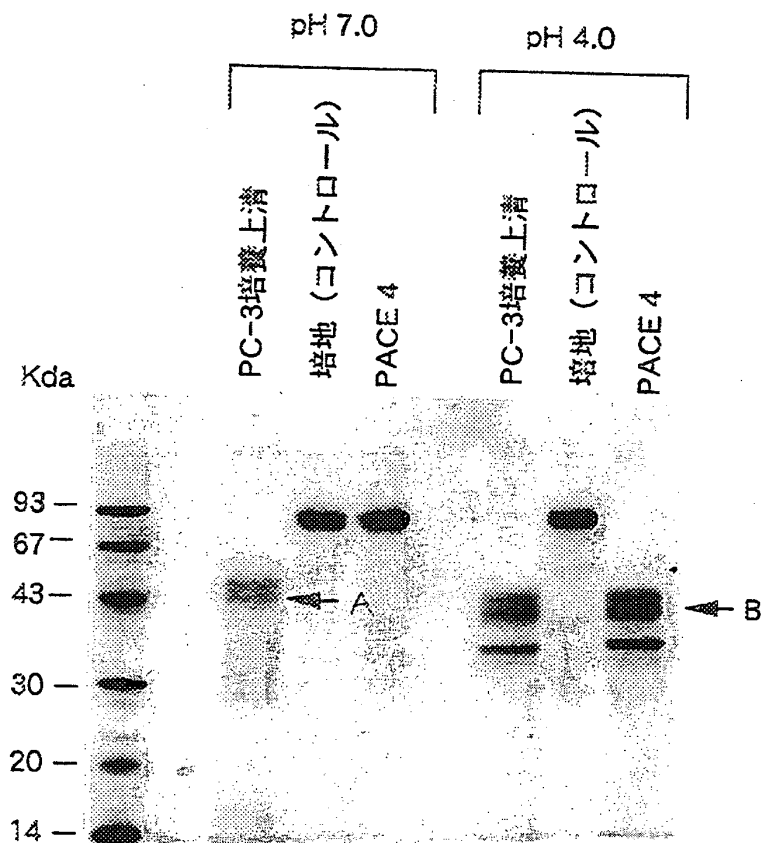






6/16

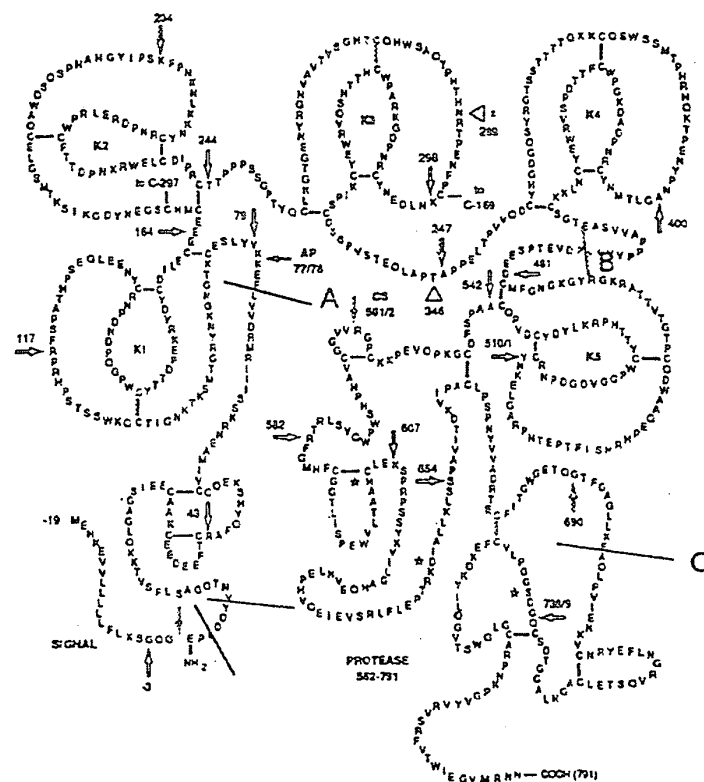
図 6





7/16

7

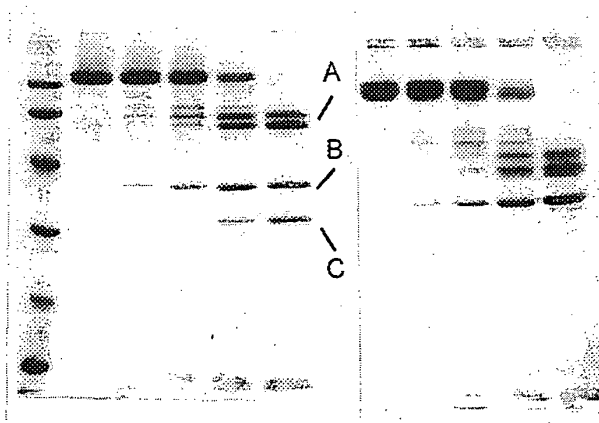


還元型

非還元型

0 15 30 60 120分

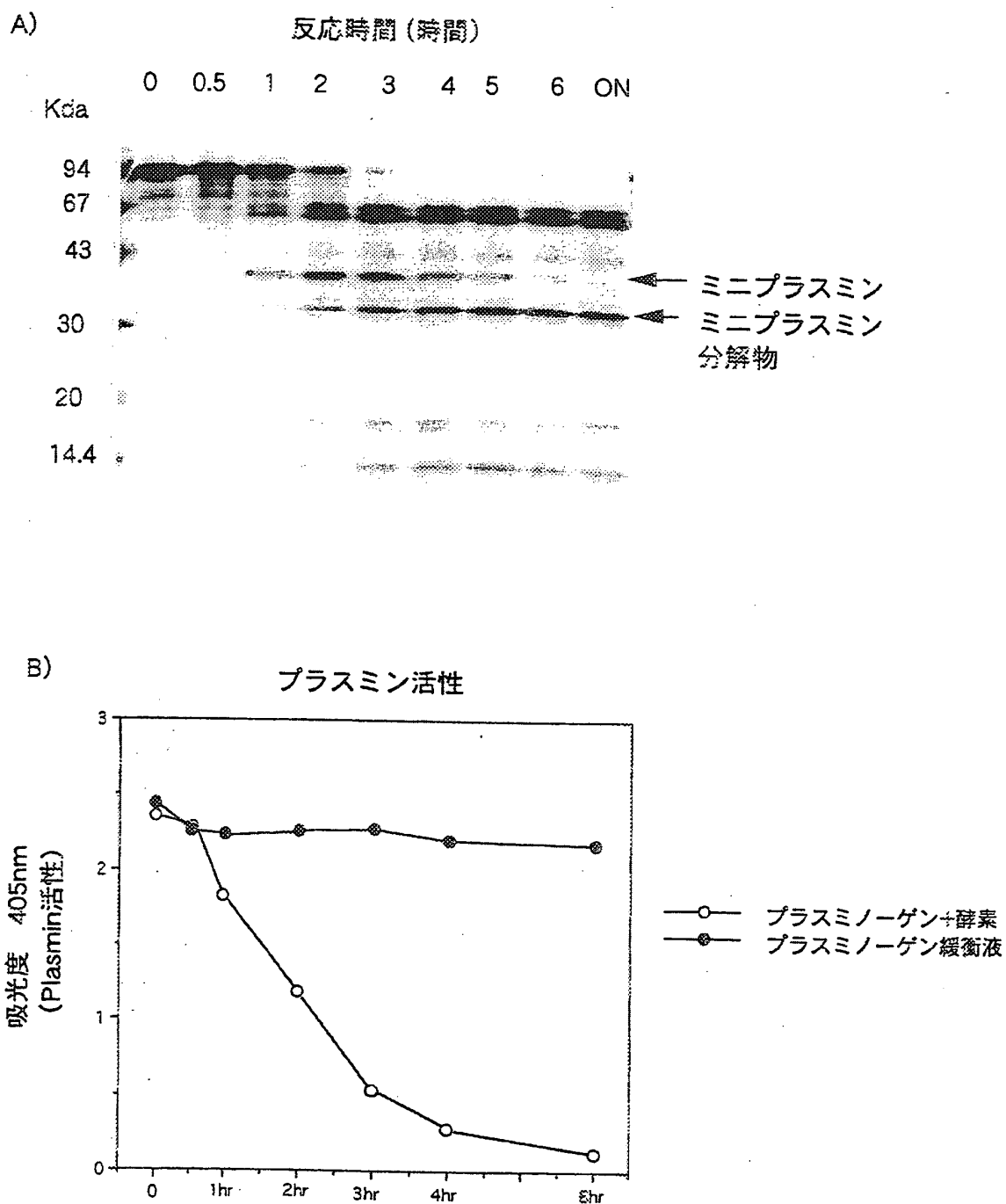
0 15 30 60 120分





8/16

図 8

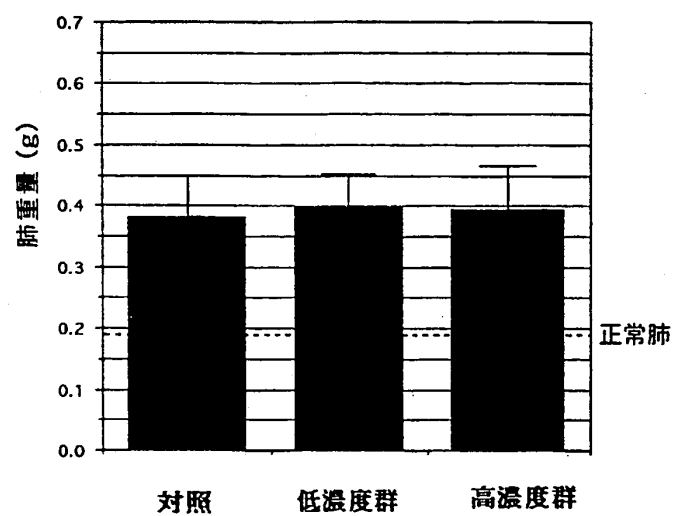




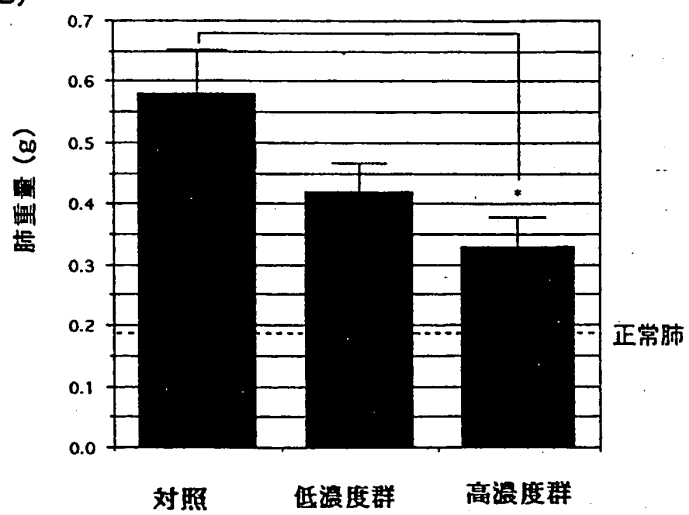
9/16

図 9

A)



B)







10/16

図 10

A)

## SDS-PAGE

		H		H	C		
	N	U	P	e	O	M	L
P	K	V	C	p	L	C	L
L	L	E	-	G	O	F	/
G	F	C	3	2	N	7	2



B)

抗プラスミノーゲン抗体を用いた  
ウエスタンブロット

		H		H	C		
	N	U	P	e	O	M	L
P	K	V	C	p	L	C	L
L	L	E	-	G	O	F	/
G	F	C	3	2	N	7	2

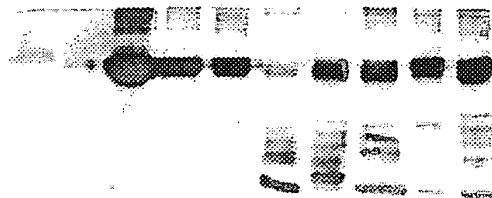
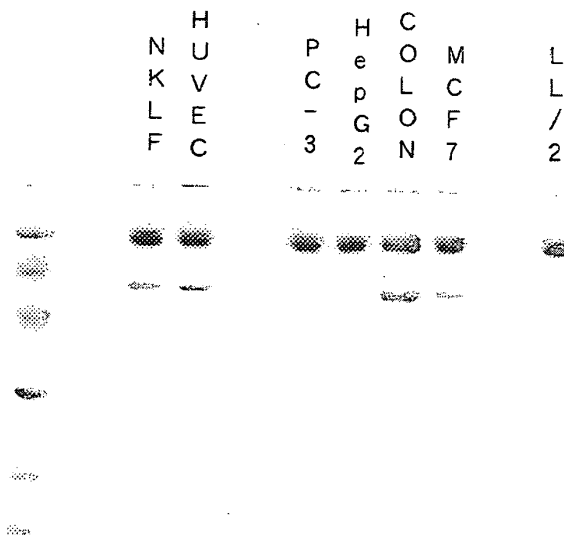




図10 (続き)

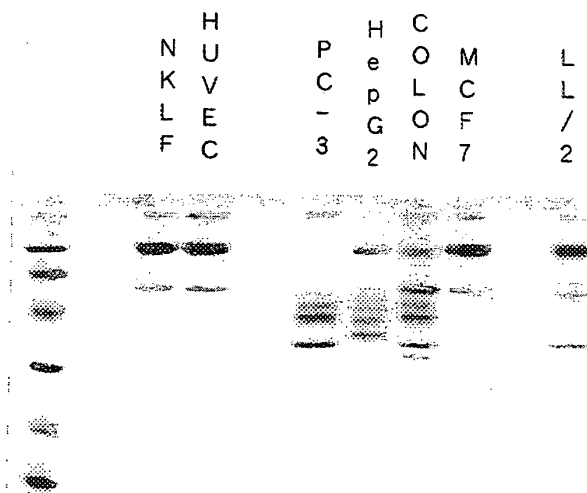
C)

ペプスタチンA(アスパラギン酸酵素阻害剤)  
存在下での切断様式



D)

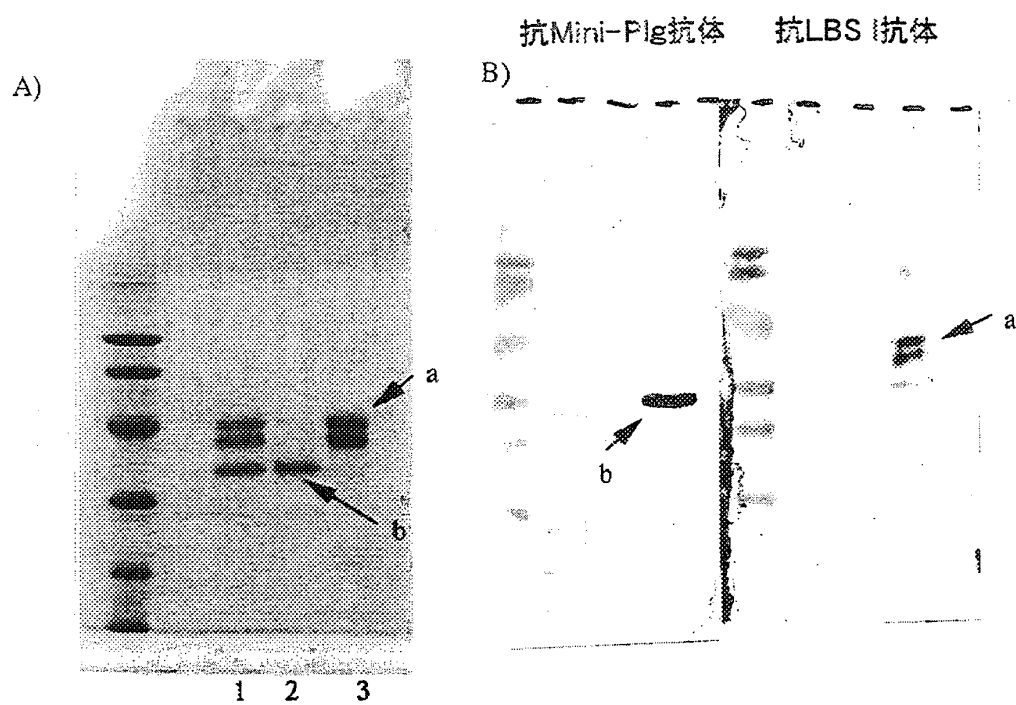
E-64(システイン酵素阻害剤)  
存在下での切断様式





12/16

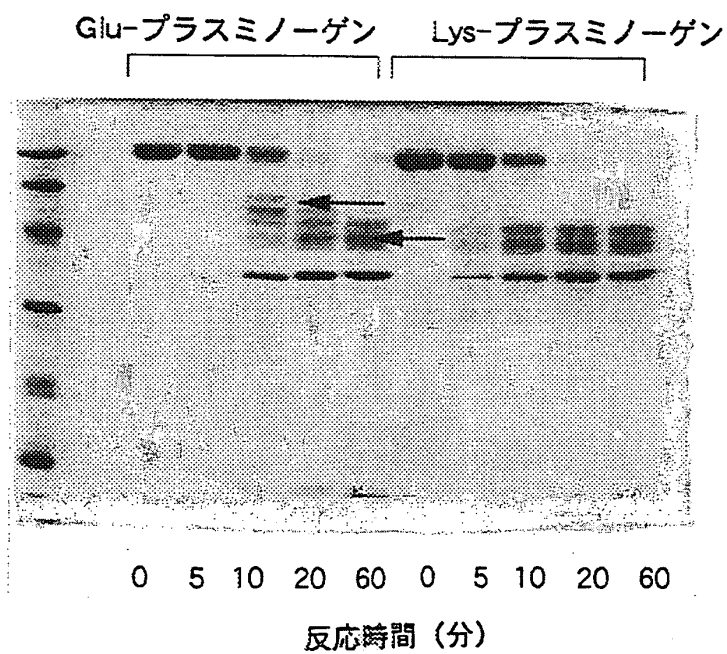
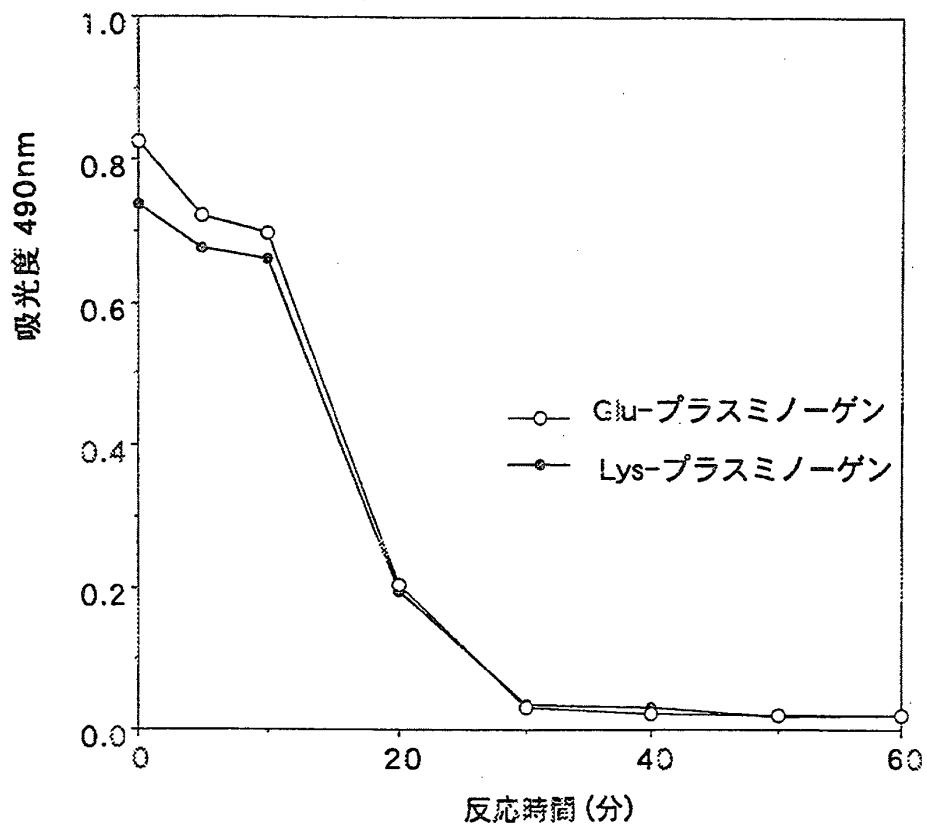
図 1 1





13/16

図 1 2







14/16

図 13

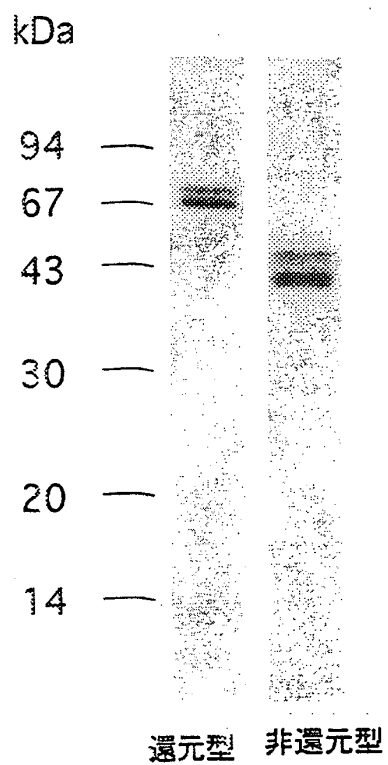
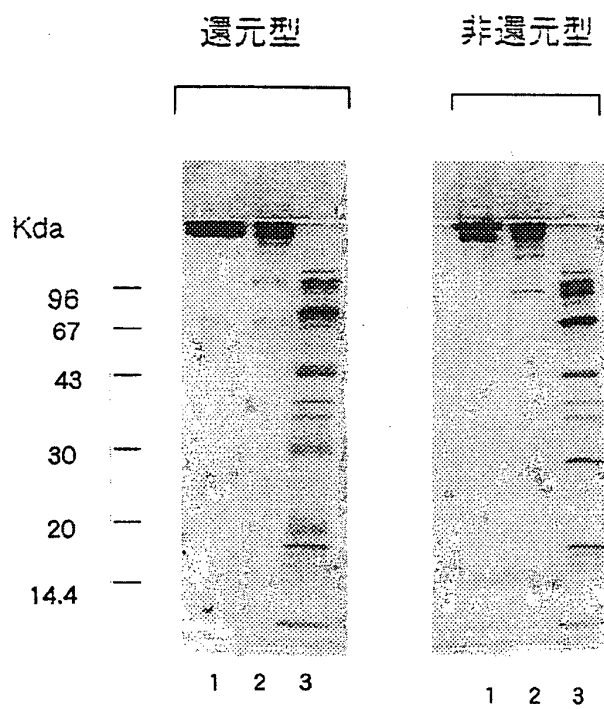




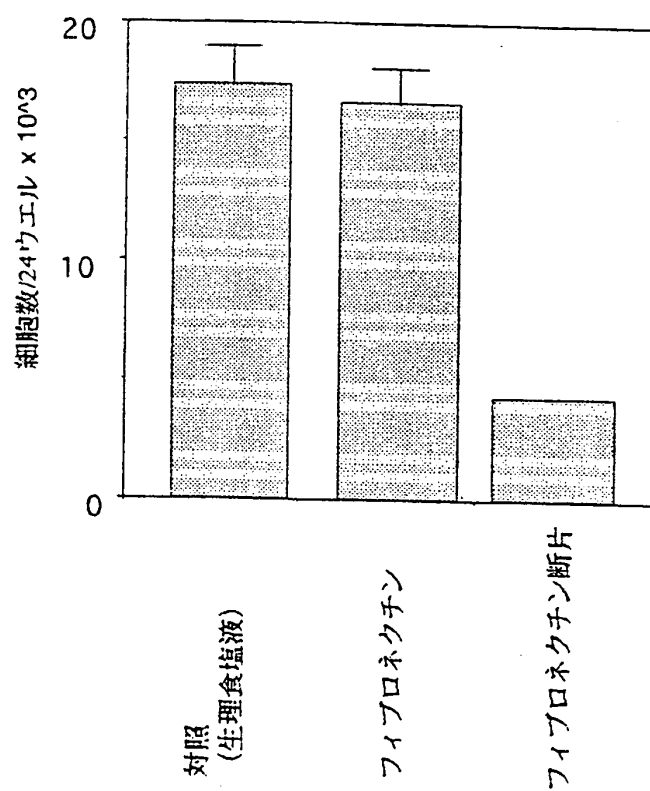
図 1 4





16/16

図 15





## SEQUENCE LISTING

<110> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> Enzyme Producing Plasma Protein Fragment Having Activity to  
Inhibit Cancer Metastasis and Cancer Cell Growth and Plasma Protein  
Fragment Produced by said Enzyme

<130> 661533

<160> 1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Human Cancer Cell

<400> 1

Leu Val Arg Ile Pro Leu His Lys Phe Thr

1

5

10





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05322

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745,  
C07K1/22, A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745,  
C07K1/22, A61K38/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Gately S, et al., "Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin.", Cancer Res (1996), 56(21), pages 4887-4890	1-14
Y	Soff GA, et al., "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model.", J Clin Invest. , (1995), 96(6), pages 2593-2600	1-14
A	O'Reilly MS, et al., "Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice.", Nat Med. (1996), 2(6), pages 689-692	1-14
A	O'Reilly MS, et al., "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.", Cell. (1994), 79(2), pages 315-328	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 December, 1999 (21.12.99)

Date of mailing of the international search report  
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05322

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gately S, et al., "The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin.", Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. (1997), 94(20), pages 10868-10872	1-14
A	Briozzo P, et al., "In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells.", Cancer Res. (1988), 48(13), pages 3688-3692	1-14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745,  
C07K1/22, A61K38/48

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N9/50, C07K14/78, C07K14/745,  
C07K1/22, A61K38/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Gately S, et. al., 「Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin.」, Cancer Res (1996), 56(21), p. 4887-4890.	1-14
Y	Soff GA, et al., 「Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model.」, J Clin Invest. , (1995), 96(6), p. 2593-2600.	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.12.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

斉藤真由美

4N 9839

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	O'Reilly MS, et al., 「Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice.」, Nat Med. (1996), 2(6), p. 689-692.	1 - 1 4
A	O'Reilly MS, et al., 「Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.」, Cell. (1994), 79(2), p. 315-328.	1 - 1 4
A	Gately S, et al., 「The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin.」, Proc Natl Acad Sci U S A. (1997), 94(20), p. 10868-10872.	1 - 1 4
A	Briozzo P, et al., 「In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells.」, Cancer Res. (1988), 48(13)p. 3688-3692.	1 - 1 4



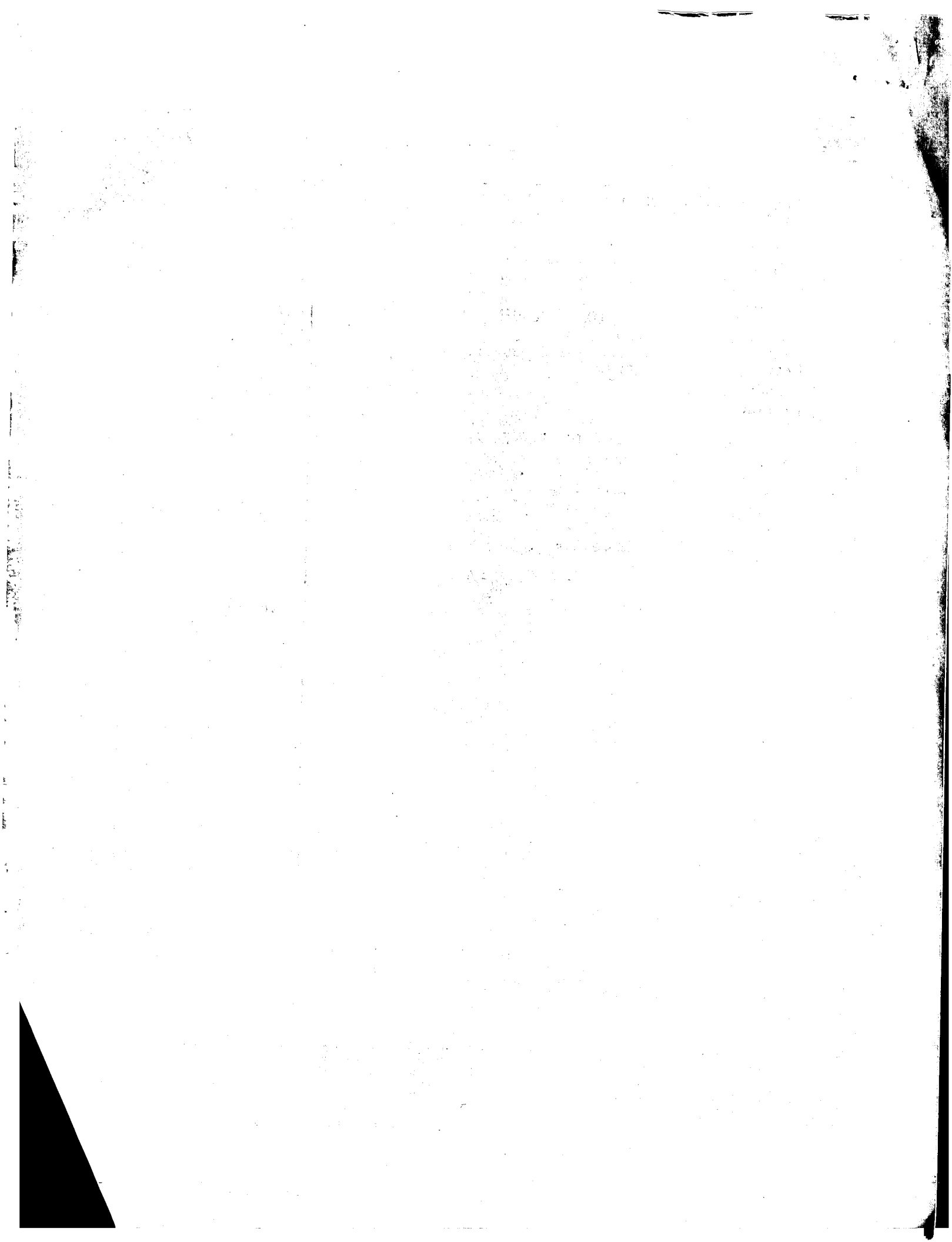
European Patent  
Office

**SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number  
EP 99 97 0118

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	FAUST, PH L ET AL: "CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF CDNA FOR HUMAN CATHEPSIN D" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 82, 1 August 1985 (1985-08-01), pages 4910-4914, XP002052494 ISSN: 0027-8424 * figure 4 *	1-4	C12N15/00 C12N9/50 C07K14/78 C07K14/745 C07K1/22 A61K38/48
X	US 5 198 423 A (AZUMA ICHIRO ET AL) 30 March 1993 (1993-03-30) * column 2, line 6-11, 20-22 * * column 5, line 9-11 * * column 7, line 7-24 * * column 9, line 60-62 * * claims 1,2; example 6 * --- -/--	1-6, 8-14	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)  C12N C07K A61K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search <b>MUNICH</b>		Date of completion of the search <b>31 January 2003</b>	Examiner <b>Seroz, T</b>
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

EPO FORM 1503 03/82 (P04C04)





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	CAO ET AL: "KRINGLE DOMAINS OF HUMAN ANGIOSTATIN. CHARACTERIZATION OF THE ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY ON ENDOTHELIAL CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 46, 15 November 1996 (1996-11-15), pages 29461-29467, XP002086445 ISSN: 0021-9258	5-7,13,14	
Y	* page 29462, left-hand column, last paragraph * * figures 1,3,6 * * page 29462, right-hand column, line 16,17 * * page 29463, right-hand column, paragraph 2 - page 29464, left-hand column, line 2 * * page 29465, right-hand column, line 38-43 * * page 29466, left-hand column, last paragraph *	9,10	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
X	SIM ET AL: "A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 57, no. 7, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 1329-1334, XP002100107 ISSN: 0008-5472	5-7,13,14	
Y	* page 1329, right-hand column, last paragraph * * page 1331, right-hand column, last paragraph - page 1333, left-hand column, paragraph 1 * * page 1334, left-hand column, last paragraph *	13,14	
	--- -/--  The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.		
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 31 January 2003	Examiner Seroz, T
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document	

4  
EPO FORM 1503 03/82 (P04C04)







DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)				
X	LIJNEN H R ET AL: "Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3)." BIOCHEMISTRY, vol. 37, no. 14, 7 April 1998 (1998-04-07), pages 4699-4702, XP002215765 ISSN: 0006-2960	5-7					
Y	* page 4701, left-hand column, line 27 - page 4701, right-hand column, last paragraph *	9,10,13, 14					
X	EP 0 837 074 A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO) 22 April 1998 (1998-04-22) * page 6, line 46-48 * * claims 1-7 * *sequences SEQ ID No 1-13*	5,6,8, 13,14					
X	MATSUMOTO Y ET AL: "INHIBITORY EFFECT OF ANTIMETASTATIC FUSION POLYPEPTIDE OF HUMAN FIBRONECTIN ON TUMOR CELL ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRICES" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 82, no. 10, October 1991 (1991-10), pages 1130-1138, XP000984063 ISSN: 0910-5050 * page 1131, left-hand column, line 27 - page 1131, right-hand column * * page 1137, left-hand column, last paragraph - page 1137, right-hand column * * figure 1 *	8,13,14	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)				
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.							
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 31 January 2003	Examiner Seroz, T				
<table border="0"><tr><td>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</td><td>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- &amp; : member of the same patent family, corresponding document</td></tr><tr><td>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</td><td></td></tr></table>				CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document	X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document						
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document							

4  
EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
A	SAIKI I ET AL: "INHIBITION OF LUNG METASTASIS BY SYNTHETIC AND RECOMBINANT FRAGMENTS OF HUMAN FIBRONECTIN WITH FUNCTIONAL DOMAINS" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 81, no. 10, 1990, pages 1003-1011, XP001106752 ISSN: 0910-5050		
T	MORIKAWA WATARU ET AL: "Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 49, 8 December 2000 (2000-12-08), pages 38912-38920, XP002215766 ISSN: 0021-9258		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 31 January 2003	Examiner Seroz, T
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons &amp; : member of the same patent family, corresponding document</p>			



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 97 0118

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

31-01-2003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5198423 A	30-03-1993	JP 2311498 A	27-12-1990
		JP 2561149 B2	04-12-1996
		JP 2862140 B2	24-02-1999
		JP 3173828 A	29-07-1991
		DE 69006100 D1	03-03-1994
		DE 69006100 T2	04-08-1994
		EP 0399806 A1	28-11-1990
EP 0837074 A	22-04-1998	EP 0837074 A2	22-04-1998
		JP 10147600 A	02-06-1998
		US 6274704 B1	14-08-2001

